

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



**Biochemické vlastnosti kvartérních benzo(c)fenanthrenových  
alkaloidů**

**Biochemical properties of quaternary benzo(c)phenanthrene  
alkaloids**

**Bakalářská práce**

Lenka Přenosilová

Školitel: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 1. června 2010

.....

Lenka Přenosilová

**Poděkování:**

Děkuji své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za kvalitní odborné vedení, všestrannou pomoc, za cenné a inspirující připomínky a rady při vypracování této práce.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantů GAČR (P301/10/0356) a MŠMT ČR (MSM 0021620808).

## Obsah

<b>Abstrakt</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>1. Cíl práce</b>	<b>7</b>
<b>2. Úvod</b>	<b>8</b>
<b>3. Biologicky významné kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy</b>	<b>8</b>
3.1 Sanguinarin a příbuzné látky jako rostlinné produkty	8
3.2 Chemická struktura a vlastnosti kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů	12
3.3 Biologické (fyziologické) účinky kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů	19
3.3.1 Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů	19
3.3.2 Biologické účinky sanguinarinu	20
3.3.3 Biologické účinky chelerythrinu	21
3.3.4 Společné účinky sanguinarinu a chelerythrinu- apoptóza	22
3.3.5 Přípravky obsahující směs sanguinarinu a chelerythrinu a jejich využití	24
<b>4. Metabolismus kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů</b>	<b>26</b>
<b>5. Metody určení struktury metabolitů kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů</b>	<b>29</b>
<b>6. Xenobiotika</b>	<b>30</b>
6.1 Biotransformace xenobiotik	31
6.2 Enzymy metabolizující cizorodé látky	32
<b>7. Enzymy metabolizující kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy</b>	<b>39</b>
7.1 Určení enzymů zodpovědných za metabolismus kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů jako cíl dalších studií	40
<b>8. Závěr</b>	<b>40</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>42</b>
<b>Seznam použité literatury</b>	<b>44</b>

## Abstrakt

Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy jsou rostlinné produkty, nalezené v celé řadě rostlin. Nejbohatším zdrojem jsou především rostliny z kmene *Chelidoniae* a čeledi *Papaveraceae*. Základem struktury kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů (sanguinarin, chelerythrin, sanguiluthin, sanguirubin, chelirubin, cheliluthin, makarpin) je *N*-methylbenzo(c)fenanthridiniový kationt. Chemická struktura kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů souvisí s jejich cytotoxickými vlastnostmi, se schopností interkalace do DNA a se schopností fluorescence. Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy se vyskytují ve dvou formách, mezi kterými funguje reverzibilní rovnováha v závislosti na pH prostředí. Velmi důležité jsou biologické účinky kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů. Tyto alkaloidy by mohly být využity jako fluorescenční DNA sondy a jako supravitální barviva nukleových kyselin. Jednotlivé kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy mají mnoho využití. Sanguinarin se využívá pro své antiplakové a protizánětlivé účinky v ústní hygieně. Pro jeho působení proti srážlivosti krevních destiček může hrát důležitou roli v prevenci kardiovaskulárních chorob. Sanguinarin je možné využít i jako potenciální cytostatikum k léčbě rakoviny. Chelerythrin má podobné využití v přípravcích ústní hygieny a je znám i pro své antimykotické účinky na některé kmeny mikroorganismů. Společným účinkem sanguinarinu a chelerythrinu je indukce apoptózy buněk. Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy se biosyntetizují z aromatických aminokyselin tyrosinu a fenylalaninu. V metabolismu sanguinarinu v organismu je prvním krokem redukce iminiové vazby v kationtové formě vedoucí ke vzniku dihydrosanguinarinu. Dihydrosanguinarin je v současnosti označován za metabolický produkt biotransformace sanguinarinu. Metabolické produkty biotransformace kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů se určovaly chromatografickými a spektroskopickými metodami.

**Klíčová slova:** kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy, sanguinarin, chelerythrin, cytochrom P450, xenobiotika, apoptóza

## Abstract

Quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids are plant products found in many plants. The richest sources are mainly *Chelidoniaeae* plants and the family *Papaveraceae*. The basis of the structure of quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids (sanguinarine, chelerythrine, sanguiluthine, sanguirubine, chelirubine, cheliluthine, macarpine) is *N*-methylbenzo(c)phenanthridine cation. Chemical structure of quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids related to their cytotoxic properties, the ability to intercalation into DNA and the fluorescence capabilities. Quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids occur in two forms, one of which operates reversible equilibrium depending on pH. Very important are the biological effects of quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids. These alkaloids could be used as fluorescent DNA probes and as supravital dye of nucleic acids. Individual quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids have many uses. Sanguinarine is used for its antiplaque and anti-inflammatory effects of oral hygiene. For its effect against the coagulation of blood platelets may play an important role in preventing cardiovascular diseases. Sanguinarine may be used as a potential cytostatic drug for the treatment of cancer. Chelerythrine is similar to use in oral hygiene products and is known for its antifungal effects of some strains of microorganisms. The combined effect of sanguinarine and chelerythrine is the induction of apoptosis of cells. Quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids are biosynthetized from aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine. The first step of the sanguinarine metabolism in organisms is the reduction of iminium bond in its cation form, leading to formation of dihydrosanguinarine. Dihydrosanguinarine is evaluated to be the major metabolic product of sanguinarine biotransformation. Metabolic products of metabolism of quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids were determined by chromatographic and spectroscopic techniques.

**Key words:** quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids, sanguinarine, chelerythrine, cytochrom P450, xenobiotics, apoptosis

## **1. Cíl práce**

Cílem práce je shrnutí dosavadních literárních poznatků (rešerže) o kvartérních benzo(c)fenanthridinových (benzo(c)fenanthrenových) alkaloidech, především sanguinarinu a jeho příbuzných alkaloidech a poukázat na nové směry, které by měly být předmětem dalšího výzkumu.

## 2. Úvod

Alkaloidy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky, které rostlina produkuje jako sekundární metabolity nebo jako přírodní produkty [Mackraj et al., 2008]. Alkaloidy obvykle obsahují též heterocyklické struktury [Slaninová et al., 2007]. Významnou skupinou rostlinných alkaloidů jsou kvartérní benzo(c)fenanthrenové alkaloidy (sanguinarin, chelerythrin, sanguirubin, chelirubin, sanguiluthin, cheliluthin, makarpin). Literární údaje o těchto rostlinných produktech jsou uvedeny v této bakalářské práci.

## 3. Biologicky významné kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy

### 3.1 Sanguinarin a příbuzné látky jako rostlinné produkty

Kvartérní benzo(c)fenanthridinové (benzo(c)fenanthrenové) alkaloidy (QBA) patří do skupiny isochinolinových alkaloidů [Hădărugă & Hădărugă, 2009; Urbanová et al., 2009 a], do skupiny nízkomolekulárních sekundárních rostlinných metabolitů, vyskytujících se v řadě rostlinných čeledí jako jsou čeledi pryskyřníkovitých (*Ranunculaceae*), zemědýmovitých (*Fumariaceae*), routovitých (*Rutaceae*) a mákovitých (*Papaveraceae*) [Slaninová et al., 2008; Urbanová et al., 2009 b]. Mezi nejznámější, a také jediné komerčně dostupné kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy, patří sanguinarin (SA) a chelerythrin (CHE) [Slaninová et al., 2008]. Sanguinarin a chelerythrin patří mezi tzv. fytoalexiny, což jsou sekundární metabolity rostliny, které ji chrání před patogenními mikroorganismy [Psotová et al., 2006 a; Zdařilová et al., 2006; Vrublová et al., 2008]. Dalšími, již méně zastoupenými kvartérními benzo(c)fenanthridinovými alkaloidy, jsou chelirubin (CHR), cheliluthin (CHL), sanguirubin (SR), makarpin (MA) a sanguiluthin (SL) [Dostál et al., 2000; Slaninová et al., 2008; Urbanová et al., 2009 b]. Všechny tyto alkaloidy jsou intenzivně barevné, a to od žluté barvy až po tmavě červenou [Slaninová et al., 2007].

Nejbohatším zdrojem sanguinarinu a chelerythrinu je podle dosavadních studií rostlina z kmene *Chelidoniae* a čeledi *Papaveraceae* *Dicranostigma lactucoides* HOOK. f. et THOMS (Obr. 1: převzato z [http://www.asianflora.com/Papaveraceae/Dicranostigma lactucoides.htm](http://www.asianflora.com/Papaveraceae/Dicranostigma_lactucoides.htm), staženo 6.3.2010, str. 9). Tato rostlina patří mezi dvouleté byliny



přírozně se vyskytující především v subtropické oblasti východní Himaláje, ale lze ji také pěstovat v klimatických podmínkách střední Evropy. Největší podíl těchto alkaloidů byl nalezen v kořenech této rostliny (1,99% sanguinarinu a 3,43% chelerythrinu) [Suchomelová et al., 2007], což je v souladu s údaji publikovanými již dříve, kde byly nalezeny až 4% kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů v suchém kořeni této rostliny [Dostál & Slavík, 2000]. Za hlavní alkaloid v kořenech *Dicranostigma lactucoides* HOOK. f. et THOMS je považován chelerythrin. V závislosti na podmínkách pěstování se může obsah alkaloidů v rostlině i snížit [Suchomelová et al., 2007].



**Obr. 1:** *Dicranostigma lactucoides* HOOK. f. et THOMS

[převzato z [http://www.asianflora.com/Papaveraceae/Dicranostigma lactucoides.htm](http://www.asianflora.com/Papaveraceae/Dicranostigma_lactucoides.htm),  
staženo 6.3.2010]

Dalším významným zdrojem sanguinarinu a chelerythrinu je severoamerická bylina *Sanguinaria canadensis* L. z kmene *Chelidoniae* a čeledi *Papaveraceae* (Obr. 2: převzato z [http://www.missouriplants.com/Whitealt/Sanguinaria canadensis page.html](http://www.missouriplants.com/Whitealt/Sanguinaria_canadensis_page.html), staženo 6.3.2010, str. 10), která je díky svému červenému latexu, který při poranění vylučuje, nazývaná jako krevnice kanadská [Zdařilová et al., 2006], lidově jako krvavý kořen („bloodroot“) [Dostál & Slavík, 2000; Dostál, 2000]. V oddencích *Sanguinaria canadensis* L. je podíl těchto kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů více než 2x nižší než v *Dicranostigma lactucoides* HOOK. f. et THOMS. Podle dosavadní studie je hlavním alkaloidem této rostliny sanguinarin. Rostlina *Sanguinaria canadensis* L. se také zdá být nejvhodnějším zdrojem minoritních alkaloidů (chelirubin, cheliluthin,



**Obr. 2:** *Sanguinaria canadensis* L.

[převzato z [http://www.missouriplants.com/Whitealt/Sanguinaria\\_canadensis\\_page.html](http://www.missouriplants.com/Whitealt/Sanguinaria_canadensis_page.html),  
staženo 6.3.2010]

sanguirubin, sanguiluthin). Jediným minoritním alkaloidem, který nebyl nalezen v rostlině *Sanguinaria canadensis* L., je makarpin. Makarpin je obsažen pouze v kořenech rostliny *Macleaya microcarpa* (Maxim) a *Stylophorum lasiocarpum* (Oliv.). Rostlina *Sanguinaria canadensis* L. se ještě, kromě získávání kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů, využívá i jako tradiční léčivá bylina a je také jedinou rostlinou, ve které byly nalezeny sanguirubin a sanguiluthin [Suchomelová et al., 2007].

Jako další zástupce kmene *Chelidoniae* a čeledi *Papaveraceae* je známý vlaštovičník větší neboli *Chelidonium majus* L. (Obr. 3: převzato z [http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=phototheque\\_result&lettre=c](http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=phototheque_result&lettre=c), staženo 6.3.2010, str. 11). Jedná se o rostlinu hojně rostoucí v Evropě a Asii, která je od starověku používána k léčbě některých onemocnění (gastrointestinální poruchy) [Colombo & Bosisio, 1996; Hádärugă & Hádärugă, 2009; Moro et al., 2009]. Je též využívána v čínském léčitelství [Colombo & Bosisio, 1996]. Výtažky z *Chelidonium majus* L. mají antibiotické [Hádärugă & Hádärugă, 2009], protinádorové [Colombo & Bosisio, 1996], protivirové a protiplísňové účinky

[Colombo & Bosisio, 1996; Hădărugă & Hădărugă, 2009]. Rostlina je charakteristická svými žlutými květy a žlutým latexem [Dostál & Slavík, 2000; Hădărugă & Hădărugă, 2009], někdy uváděným jako oranžový [Colombo & Bosisio, 1996]. Látkám v tomto latexu se přisuzují žíravé účinky. Při požití latex způsobuje vážné podráždění sliznice dutiny ústní, krku, žaludku a střev [Moro et al., 2009]. Pro své účinky se používá tradičně při léčbě bradavic a dalších kožních onemocnění [Hădărugă & Hădărugă, 2009; Moro et al., 2009], a to přesto, že v kontaktu latexu s kůží mohou vznikat puchýře. V nejhorším případě může vyvolat i alergickou kontaktní dermatitidu [Moro et al., 2009]. Rostlina *Chelidonium majus* L. obsahuje více než 20 isochinolinových alkaloidů, především benzofenanthridinové a protoberberinové [Colombo & Bosisio, 1996; Moro et al., 2009]. Na rozdíl od výše uvedených rostlin (*Dicranostigma lactuoides* HOOK. f. et THOMS, *Sanguinaria canadensis* L.) byl největší podíl kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů v této rostlině nalezen v jejím latexu [Dostál & Slavík, 2000]. Je navíc zřejmě nejbohatším zdrojem chelirubinu [Suchomelová et al., 2007]. Sanguinarin a chelerythrin patří mezi hlavní složky izolované z kořenů této rostliny [Colombo & Bosisio, 1996].



**Obr. 3:** *Chelidonium majus* L.

[převzato z

[http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=phototheque\\_result&lettre=c](http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=phototheque_result&lettre=c),

staženo 6.3.2010]

Pravděpodobně poslední nejvíce studovanou rostlinou z hlediska obsahu kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů je *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. (Obr.

4: převzato z <http://www.asianflora.com/Papaveraceae/Macleaya-cordata.htm>, staženo 6.3.2010). Tato rostlina je též řazena do kmene *Chelidoniae* a čeledi *Papaveraceae*, která má široké využití v tradiční čínské medicíně [Stiborová et al., 2008; Zdařilová et al., 2008] především pro své analgetické, antiedemické, močopudné [Zdařilová et al., 2008], protizánětlivé a antimikrobiální účinky [Stiborová et al., 2008]. Podle dosavadních studií jsou za většinu farmakologických aktivit v této rostlině zodpovědné právě sanguinarin a chelerythrin [Zdařilová et al., 2008]. Tyto kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy jsou obsaženy především v nadzemních částech této rostliny [Zdařilová et al., 2008].



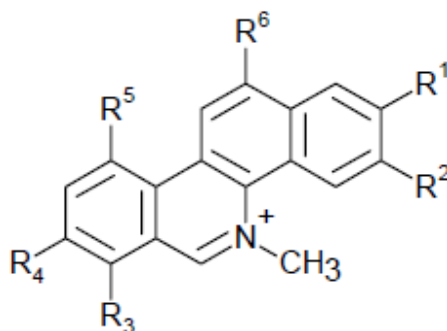
**Obr. 4:** *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.

[převzato z <http://www.asianflora.com/Papaveraceae/Macleaya-cordata.htm>, staženo 6.3.2010]

### **3.2 Chemická struktura a vlastnosti kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů**

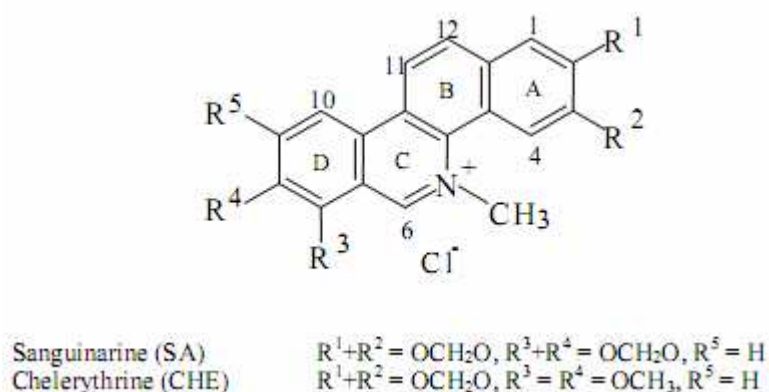
Společným základem všech těchto alkaloidů (sanguinarinu, chelerythrinu, sanguirubinu, sanguiluthinu, chelirubinu, cheliluthinu a makarpinu) je *N*-methylbenzo(c)fenanthridiniový kationt (Obr. 5: převzato z Urbanová et al., 2009 b, str. 13) s různou substitucí základní struktury především skupinami methoxylovými ( $-\text{OCH}_3$ ) a methylendioxidovými ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ) [Dostál & Slavík, 2000; Urbanová et al., 2009 b]. Součástí struktury *N*-methylbenzo(c)fenanthridiniového kationtu je atom dusíku, který se nachází v poloze 5 a nese pozitivní náboj [Urbanová et al., 2009 a]





**Obr. 5:** Chemická struktura *N*-methylbenzo(c)fenanthridiniového kationtu  
[převzato z Urbanová et al., 2009 b]

Sanguinarin (13-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-*c*]-1,3-dioxolo[4,5-*i*]fenanthridinium chlorid) společně s chelerythrinem (1,2-dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-*c*]fenanthridinium chlorid) patří mezi tzv. 2,3,7,8- tetrasubstituované alkaloidy [Dostál & Slavík, 2000; Suchomelová et al., 2007]. Obě látky byly izolovány v podobě kvartérních solí [Zdařilová et al., 2006] různých organických kyselin, které jsou polární, a proto jsou snadno extrahovány polárními rozpouštědly jako je např. methanol [Dostál, 2000]. Sanguinarin obsahuje ve své struktuře dvě  $-\text{OCH}_2\text{O}-$  skupiny v poloze 2,3 a 7,8 na rozdíl od chelerythrinu, který obsahuje pouze jednu  $-\text{OCH}_2\text{O}-$  skupinu, a to v poloze 2,3. V poloze 7 a 8 obsahuje chelerythrin skupiny  $-\text{OCH}_3$  (Obr. 6: převzato z Malíková et al., 2006). Chelerythrin vykazuje nižší cytotoxicitu než sanguinarin právě díky dvěma  $-\text{OCH}_3$

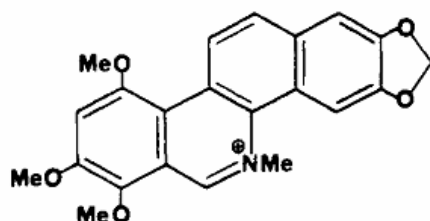


**Obr. 6:** Chemická struktura sanguinarinu ( $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{NO}_4^+$ ) a chelerythrinu ( $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$ )  
[převzato z Malíková et al., 2006]

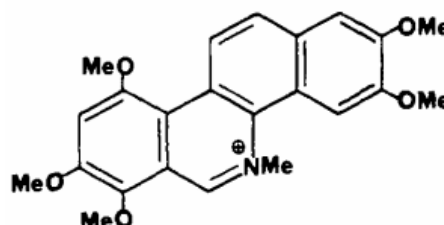
skupinám [Colombo & Bosisio, 1996]. Chelerythrin patří mezi ty alkaloidy, které mají sníženou schopnost interkalovat do DNA právě díky methoxylové skupině v poloze 7, ještě společně s cheliluthinem a sanguiluthinem [Slaninová et al., 2008]. Tyto skupiny obsahující kyslík se označují jako elektrondonorové a ve vazbě s kondenzovanými aromatickými jádry mají funkci chromoforů. Ty jsou zodpovědné za barevnost a schopnost fluorescence kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů [Slaninová et al., 2007; Slaninová et al., 2008; Urbanová et al., 2009 b]. Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy vykazují funkci chromoforů a fluorescenční vlastnosti také díky konjugovanému aromatickému charakteru [Urbanová et al., 2009 a].

Další dvojicí kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů je sanguiluthin a cheliluthin, které se řadí mezi pentasubstituované alkaloidy [Dostál & Slavík, 2000]. Ve struktuře se od sebe liší v poloze 2 a 3. Na rozdíl od cheliluthinu, který má methylenedioxylovou skupinu ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), jsou u sanguiluthinu v obou polohách přítomné dvě methoxylové skupiny ( $-\text{OCH}_3$ ) (Obr. 7: převzato z Krane et al., 1984). Udává se, že methoxylové skupiny v polohách 2 a 3 jsou zodpovědné za toxicitu alkaloidů. Při studiu toxicity sanguiluthinu a cheliluthinu bylo zjištěno, že sanguiluthin vykazoval vyšší toxicitu pro všechny typy buněk užitých pro testování než cheliluthin [Slunská et al., 2010].

CHELILUTINE



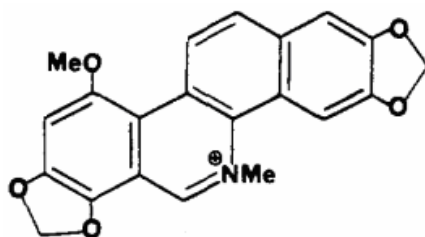
SANGUILUTINE



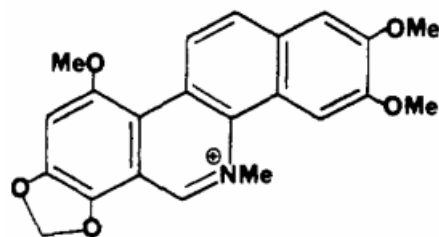
**Obr. 7:** Chemická struktura cheliluthinu ( $\text{C}_{22}\text{H}_{10}\text{NO}_5^+$ ) a sanguiluthinu ( $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{NO}_5^+$ )  
[převzato z Krane et al., 1984]

Dalšími pentasubstituovanými alkaloidy jsou chelirubin a sanguirubin (Obr. 8: převzato z Krane et al., 1984 a upraveno, str. 15) [Dostál & Slavík, 2000], které se ve struktuře odlišují v poloze 2 a 3. Sanguirubin obsahuje v těchto polohách  $-\text{OCH}_3$  skupiny, a je proto označován za více toxický než chelirubin [Slunská Z. et al., 2010]. Chelirubin má ve své struktuře v poloze 2 a 3 místo dvou  $-\text{OCH}_3$  skupin jednu  $-\text{OCH}_2\text{O}-$  skupinu.

CHELIRUBINE



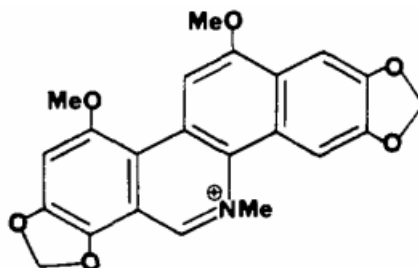
SANGUIRUBINE



**Obr. 8:** Chemická struktura chelirubinu ( $C_{21}H_{16}NO_5^+$ ) a sanguirubinu ( $C_{22}H_{20}NO_5^+$ )  
[převzato z Krane et al., 1984 a upraveno]

Posledním více studovaným kvartérním benzo(c)fenanthridinovým alkaloidem je makarpin (Obr. 9: převzato z Krane et al., 1984), který patří mezi hexasubstituované alkaloidy [Dostál & Slavík, 2000]. Jako jediný z těchto uvedených kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů má v poloze 12 substituovanou  $-OCH_3$  skupinu. Jeho struktura se nejvíce podobá chelirubinu, kterému právě v poloze 12 tato skupina chybí.

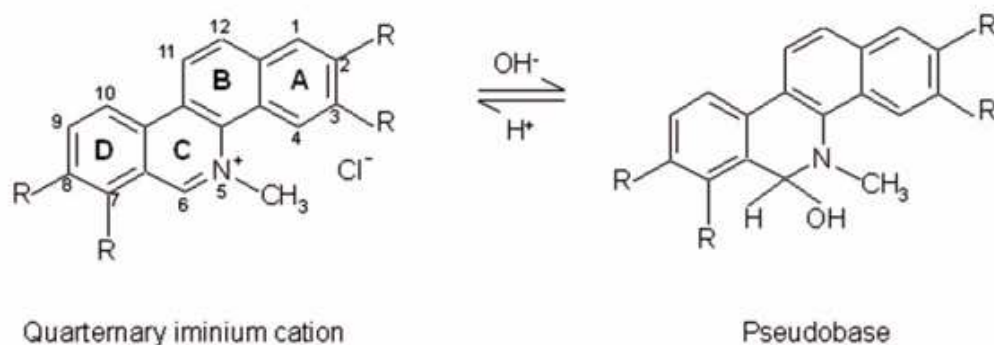
MACARPINE



**Obr. 9:** Chemická struktura makarpinu ( $C_{22}H_{18}NO_6^+$ )  
[převzato z Krane et al., 1984]

Z chemického hlediska se kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy vyskytují ve dvou formách, mezi kterými funguje reverzibilní rovnováha závislá na pH prostředí (Obr. 10: převzato z Absolínová et al., 2009, str. 16) [Dostál, 2000; Dostál & Slavík, 2000; Zdařilová et al., 2006; Mackraj et al., 2008; Slaninová et al., 2008; Absolínová et al., 2009]. Tato rovnováha by mohla hrát klíčovou roli v izolaci alkaloidů z rostlinných

extraktů [Dostál, 2000]. Jedna z forem se označuje jako kvartérní neboli iminiová, která převládá v kyselém prostředí [Slaninová et al., 2008; Urbanová et al., 2009 a]. Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy reagují s DNA prostřednictvím interkalace, kdy dochází k vmezeření alkaloidu v kvartérní formě mezi dvě vlákna dvoušroubovice [Colombo & Bosisio, 1996; Slaninová et al., 2007; Urbanová et al., 2009 b]. Dochází ke tvorbě komplexu alkaloidu s DNA a zcela vložený alkaloid dále interaguje s přilehlými základními páry bází v DNA [Colombo & Bosisio, 1996; Marek et al., 1999]. Schopnost interkalace je v případě sanguinarinu a chelerythrinu srovnatelná s typickým interkalátorem ethidiumbromidem [Colombo & Bosisio, 1996; Slaninová et al., 2008]. Ten společně s propidiumjodidem patří mezi fenanthridiny, které jsou typickými interkalačními barvivy [Slaninová et al., 2007]. Tato barviva jsou na rozdíl od kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů nepropustná pro buňky s neporušenou membránou [Slaninová et al., 2007]. Iminiová vazba v kationtové formě  $C_6=N^+$  je náchylná k nukleofilnímu ataku (hlavně SH-sloučenin) [Marek et al., 1999; Dostál & Slavík, 2000; Malíková et al., 2006; Psotová et al., 2006 b; Mackraj et al., 2008], dále může reagovat s aniontovými částmi aminokyselin v biomakromolekulách [Dvořák & Šimánek, 2007]. Hraje pravděpodobně i klíčovou roli v inhibici SH-proteinů [Malíková et al., 2006]. Redukce iminiové vazby probíhá pomocí NADH/NADPH [Psotová et al., 2006 b; Mackraj et al., 2008].

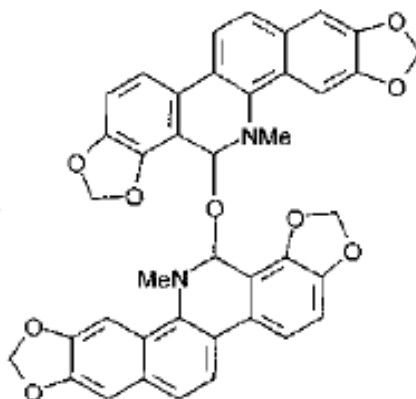


**Obr. 10:** Rovnováha mezi kvartérním iminiovým kationem a pseudobází  
kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů  
[převzato z Absolínová et al., 2009]



Druhá forma kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů se označuje jako pseudobáze neboli alkanolamin (6-hydroxy-5,6-dihydroderivát) [Zdařilová et al., 2006; Slaninová et al., 2008]. Také tato forma může být zapojena do interakce s buněčnými biomakromolekulami [Malíková et al., 2006]. Nedávno byla popsána vratná nekovalentní interakce této formy s SH-proteiny, tedy proteiny obsahujícími thiolovou skupinu L-cysteinu ve své molekule [Zdařilová et al., 2006; Dvořák & Šimánek, 2007]. Rozdíl obou forem kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů spočívá v jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, vzhledu, výskytu, praktickém využití, biologické dostupnosti [Dostál, 2000] a chemické struktuře. Pseudobáze, jinak také označována jako hydroxyadukt, je bezbarvá, nepolární a nerozpustná ve vodě [Dostál & Slavík, 2000; Slaninová et al., 2008]. Rozpustná je ve středně polárních organických rozpouštědlech [Absolínová et al., 2009]. Z hlediska struktury má na atomu uhlíku C6 kovalentně vázanou hydroxylovou skupinu [Dostál & Slavík, 2000]. Uvádí se, že v případě sanguinarinu probíhá na atomu uhlíku C6 fotochemická oxidace na oxysanguinarin, a to v silně alkalických roztocích [Absolínová et al., 2009]. Oxysanguinarin byl identifikován jako vedlejší produkt vytvořený disproportionací přechodné pseudobáze [Dostál et al., 1996]. Dále bylo zjištěno, že hydroxylová skupina zvyšuje nedostatek elektronů na uhlíku ve vazbě  $C_6=N^+$ , kdy dochází ke vzniku nestabilního hydroxyaduktu, který okamžitě podstupuje kondenzační reakci za uvolnění molekuly vody. V případě sanguinarinu pak vytváří bis(dihydrosanguinarinyl)ether (Obr. 11: převzato z Dostál & Slavík, 2000, str. 18) [Dostál, 2000; Dostál & Slavík, 2000]. Podobná konstituce báze byla nalezena i u chelerythrinu, chelirubinu a cheliluthinu. V případě sanguiluthinu byla nalezena skutečná heterocyklická pseudobáze [Dostál & Slavík, 2000]. Uvádí se, že kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy pronikají přes buněčnou membránu právě v podobě neutrální pseudobáze [Malíková et al., 2006; Psotová et al., 2006 b; Slaninová et al., 2008], která preferenčně existuje za fyziologických hodnot pH (7,2-7,4) [Zdařilová et al., 2006] a pravděpodobně vznikla redukcí kvartérní formy [Slaninová et al., 2008]. Reducí kvartérní iminiové formy na alkanolamin dochází ke zvyšování lipofility kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů [Zdařilová et al., 2006; Dvořák & Šimánek, 2007]. V případě sanguinarinu bylo uvedeno, že by redukce kvartérní iminiové formy mohla mít za následek zvýšení biologické dostupnosti alkaloidu [Dvořák & Šimánek, 2007]. Pseudobáze je aktivnější formou chelerythrinu než je forma kationtová [Psotová et al., 2006 b]. Kvartérní forma se na rozdíl od pseudobáze vyznačuje svou barevností, rozpustností ve

vodě [Dostál & Slavík, 2000] a polaritou [Slaninová et al., 2008]. Po alkalizaci kvartérní formy chelerythrinu mizí její barva a přechází na neutrální pseudobázi [Dostál & Slavík., 2000; Absolínová et al., 2009] a naopak, tzn. bezbarvá pseudobáze se v přítomnosti kyseliny převede na barevnou kvartérní formu [Dostál et al., 1996; Dostál & Slavík, 2000]. Tento děj vysvětluje použití kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů jako acidobazických indikátorů. Např. sanguinarin je v kyselém prostředí



**Obr. 11:** Chemická struktura bis(dihydrosanguinarinyl)etheru  
[převzato z Dostál & Slavík, 2000]

červený a v alkalickém prostředí bezbarvý [Dostál, 2000; Slaninová et al., 2008]. V poslední době byla rovněž navržena existence aniontové formy kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů [Janovská et al., 2009]. Molekulární forma kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů též určuje jejich lokalizaci v buňkách. Příkladem může být kationtová forma alkaloidů, jež se váže především na DNA. Jiné formy alkaloidů mají schopnost vazby uvnitř buněk na jiné části, jako jsou např. lysozomy. V souvislosti s kationtovou formou byla nalezena její vazba na  $\beta$ -strukturu DNA [Slaninová et al., 2007]. Kationtová forma sanguinarinu se na  $\beta$ -strukturu DNA váže mechanismem interkalace, a to přednostně na střídající se GC sekvence párů bází [Das et al., 1999].

### **3.3 Biologické (fyziologické) účinky kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů**

Jednotlivé kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy se liší svými biologickými aktivitami, které jsou neustálým předmětem zkoumání pro jejich potenciální léčivé účinky.

#### **3.3.1 Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů**

V souvislosti s biologickými účinky se sleduje vzájemné působení kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů s buněčnými kulturami [Slunská et al., 2010], schopnost vazby těchto alkaloidů na DNA a jejich využití jako DNA sond prostřednictvím schopnosti fluorescence kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů [Slaninová et al., 2008; Urbanová et al., 2009 b].

Pro kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy byla prokázána schopnost barvit intracelulární struktury včetně jader [Slaninová et al., 2007]. Odlišné fluorescenční vlastnosti jednotlivých kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů jsou závislé na jejich struktuře, kdy větší počet kondenzovaných aromatických kruhů způsobuje, že excitace i emise těchto látek je posunuta do vyšších vlnových délek, stejně jako methylendioxidová skupina místo dvou methoxylových skupin. Tyto vlastnosti jsou též závislé na pH prostředí a typu rozpouštědla, ve kterém jsou látky rozpuštěny. Rozpouštědlo, které obsahuje např. jodidové ionty, fluorescenční schopnosti snižuje [Slaninová et al., 2008].

Pro kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy bylo zjištěno, že pronikají velmi rychle do živých buněk přes buněčnou membránu [Slaninová et al., 2007; Slaninová et al., 2008; Urbanová et al., 2009 b] a kvantitativně se vážou na DNA [Urbanová et al., 2009 b]. Některé kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy pronikají do živých impermeabilizovaných (nepropustných) buněk. Mohly by se tedy uplatnit jako tzv. supravitální DNA sondy [Urbanová et al., 2009 b], ve fluorescenční mikroskopii a průtokové cytometrii [Slaninová et al., 2007]. Jednotlivé kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy se také liší v tom, do jakých částí buněk se přednostně váží. Sanguinarin, makarpin, chelirubin byly po přidání k buněčným kulturám nalezeny v jádrech buněk, kde vykazovaly jasně červenou fluorescenci, na rozdíl od sanguiluthinu, cheliluthinu a chelerythrinu, které byly lokalizovány pouze v blízkosti jádra [Slaninová et al., 2008]. Díky skutečnosti, že

makarpin, chelirubin a sanguinarin barví přednostně jaderné buňky, by je bylo možné využít k diferenciaci jaderných buněk od buněk bez jádra [Slaninová et al., 2007]. V jedné z nových publikací [Slunská et al., 2010] se naopak uvádí, že sanguiluthin a cheliluthin byly lokalizovány i v jádrech živých buněk. V případě sanguirubinu bylo zjištěno, že je schopen jádra značit jen částečně [Slaninová et al., 2008], ale i přes jeho schopnost značení, pouze částečného, by jej bylo možné využít jako fluorescenční DNA sondy [Urbanová et al., 2009 b]. Nejvhodnějším kvartérním benzo(c)fenanthridinovým alkaloidem, který je schopen efektivně značit jádra buněk již v nízké koncentraci je kvartérní benzo(c)fenanthridinový alkaloid makarpin. Lze jej tedy rovněž využít jako fluorescenční DNA sondy [Slaninová et al., 2008]. Makarpin společně se sanguinarinem a chelirubinem byly hodnoceny jako nová supravitální barviva nukleových kyselin pro fluorescenční mikroskopii a průtokovou cytometrii i díky tomu, že mohou vstoupit do neporušených živých buněk [Slaninová et al., 2007]. Sanguinarin a chelirubin nejsilněji interagují s DNA [Urbanová et al., 2009 b], a to mechanismem interkalace. V případě makarpinu byla nalezena jeho kvantitativní vazba na DNA společně se schopností detekce fází buněčného cyklu [Slaninová et al., 2008]. Makarpin je dále schopen nejlépe barvit DNA [Slaninová et al., 2007]. Barvení buněk pomocí makarpinu umožňuje rozlišit buňky periferní krve, jako jsou erytrocyty, retikulocyty a leukocyty. Tato sloučenina má rovněž schopnost barvit kvasinky a některé bakterie [Slaninová et al., 2007]. Všechny tyto kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy, jež jsou fluorescenčními DNA sondami, se používají právě ke značení DNA, dále k pozorování struktury jádra a jadérka a k rozlišení jaderných buněk od bezjaderných [Slaninová et al., 2008].

### **3.3.2 Biologické účinky sanguinarinu**

Sanguinarin je znám pro své široké spektrum biologických aktivit. Asi nejznámější aktivitou sanguinarinu je jeho schopnost účinného potlačování tvorby zubního plaku a snižování zánětu dásní prostřednictvím antioxidačních, antimikrobiálních a protizánětlivých účinků [Jeng et al., 2007; Serafim et al., 2008]. Díky těmto účinkům se sanguinarin používá v přípravcích ústní hygieny. Koncentrace sanguinarinu v těchto přípravcích se pohybuje okolo 300-750  $\mu\text{M}$  [Jeng et al., 2007], což je asi 0,03-0,075% sanguinarinového extraktu, z něhož 33% je sanguinarin [Mackraj et al., 2008]. Problémem

dlouhodobého používání sanguinarinu v přípravcích ústní hygieny může být vznik orální leukoplakie a premaligních lézí [Psotová et al., 2006 b; Dvořák & Šimánek, 2007; Mackraj et al., 2008; Serafim et al., 2008; Janovská et al., 2009].

Sanguinarinu je také přisuzován vznik syndromu nazývaného jako „*epidemic dropsy*“ [Mackraj et al., 2008; Janovská et al., 2009]. Tento syndrom se vyskytl u lidí po požití jedlého hořčičného oleje ředěného argemonovým olejem (obsahuje sanguinarin), získaným ze semen rostliny *Argemone mexicana* L. čeledi *Papaveraceae* [Mackraj et al., 2008; Deroussent et al., 2010]. V plazmě pacientů se syndromem „*epidemic dropsy*“ byla prokázána cytotoxicita sanguinarinu vyvolaná vyčerpáním glutathionu z organismu kvůli rychlé apoptotické odpovědi. Zjistilo se, že antioxidanty, jako je riboflavin, mohou pacienty postižené tímto syndromem v případě akutní toxicity, způsobené argemonovým olejem, ochránit [Deroussent et al., 2010].

Jedním z dalších účinků sanguinarinu je jeho působení proti srážlivosti krevních destiček, což by mohlo pomoci v prevenci a léčbě kardiovaskulárních chorob [Jeng et al., 2007] související s dysfunkcí krevních destiček [Mackraj et al., 2008]. Je známo, že krevní destičky hrají velmi důležitou roli v udržování homeostáze. Jejich zvýšená agregace je spojována s hypertenzí a aterosklerózou [Mackraj et al., 2008].

Pro své antiproliferační účinky je sanguinarin považován i za potenciální cytostatikum k léčbě rakoviny [Slunská et al., 2010]. Potenciální protinádorová aktivita sanguinarinu byla zjištěna při studii *in vitro*, za použití různých lidských buněčných linií [Deroussent et al., 2010].

Díky antihypertenzním účinkům je sanguinarin schopen snižovat krevní tlak [Mackraj et al., 2008]. Sanguinarin je také používán pro svou pozitivní efektivitu proti kašli, nachlazení a jako homeopatický přípravek [Jeng et al., 2007]. V práci Hădărugă & Hădărugă [2009] se uvádí, že má sanguinarin stimulující vliv na míšní centra, střevní peristaltiku, dále řídí zvýšení žaludeční, pankreatické, jaterní a střevní sekrece.

### **3.3.3 Biologické účinky chelerythrinu**

Dalším významným kvartérním benzo(c)fenanthridinovým alkaloidem z hlediska biologické aktivity je chelerythrin. Chelerythrin lze využít, stejně jako sanguinarin, v přípravcích ústní hygieny a jako složky přírodního krmiva. Snižuje arteriální tlak,

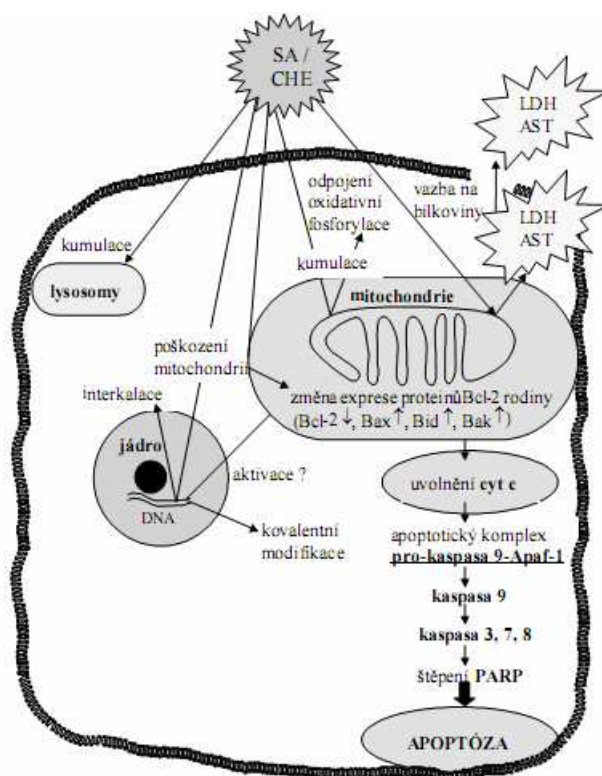
stimuluje peristaltiku a děložní stahy [Hádărugă & Hádărugă; 2009].

Chelerythrin je zajímavý především pro jeho bakteriostatickou a baktericidní aktivitu vůči gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím [Zdařilová et al., 2006]. Antimikrobiální účinek chelerythrinu byl značný na gram-pozitivní bakterie a *Candida albicans* [Colombo & Bosisio, 1996]. Frakce obsahující chelerythrin a kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy ukázaly antimykotický účinek na některé kmeny mikroorganismů *Tricophyton*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* a *Aspergillus fumigatus* [Colombo & Bosisio, 1996]. Inhibiční účinky vykazuje chelerythrin i na několik druhů mikroorganismů *Mycobacterium*, *Helicobacterium*, *Helicobacter pylori* a *Trypanosoma brucei* [Zdařilová et al., 2006].

#### **3.3.4 Společné účinky sanguinarinu a chelerythrinu- apoptóza**

Společným účinkem sanguinarinu a chelerythrinu je indukce apoptózy buněk (Obr. 12: převzato z Zdařilová et al., 2006, str. 23), která je spojena s cytotoxicitou kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů obecně [Slunská et al., 2010]. Apoptóza je typ programované buněčné smrti (PCD), závislé na signálech nebo aktivitách uvnitř umírající buňky. Charakteristickým rysem apoptózy je ztráta asymetrie fosfolipidů v membráně buněk, kondenzace chromatinu, redukce velikosti jádra, fragmentace DNA [Zdařilová et al., 2006; Slunská et al., 2010], sraštění buňky, „vydouvání“ membrány a rozpad na apoptotická tělíška, která jsou dále fagocytována bez vzniku zánětlivé reakce [Zdařilová et al., 2006]. Apoptóza je děj, který signalizuje konečné morfologické a biochemické události v buňce [Malíková et al., 2006]. Dalším typem buněčné smrti je nekróza, při které dochází k nevratnému poškození buňky, k vyplavení nitrobuněčného obsahu do okolí buněk a vzniku zánětlivé reakce a úplnému rozpadu buňky [Zdařilová et al., 2006]. Nekróza je většinou výsledkem přímého zranění a začíná obvykle na povrchu buněk [Malíková et al., 2006].

Z hlediska apoptózy existují dvě signální dráhy. Jedná se o dráhu vnitřní, kde jsou hlavním zdrojem proapoptotických signálů mitochondrie, která je řízena vzájemným působením molekul rodiny Bcl-2. Druhá dráha, vnější, je charakterizována tím, že dochází k aktivaci receptorů na plazmatické membráně buněk [Zdařilová et al., 2006]. Z hlediska



**Obr. 12:** Působení sanguinarinu a chelerythrinu na buněčné orgány a indukci apoptózy  
[převzato z Zdařilová et al., 2006]

homeostáze je buněčná smrt, stejně jako proliferace a diferenciace buněk, velmi důležitá [Malíková et al., 2006].

Součástí proteinové rodiny Bcl-2 jsou jak inhibitory, tak promotory programované buněčné smrti [Zdařilová et al., 2006]. Členové proteinové rodiny Bcl-2 regulují a vykonávají spoustu vnitřních buněčných apoptotických cest [Malíková et al., 2006], např. uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií do cytosolu [Zdařilová et al., 2006]. Antiapoptotickými proteiny této rodiny jsou např. Bcl-2, Mcl-1, a proapoptotickými proteiny např. Bax, Bak, Bad, Bik a Bid [Zdařilová et al., 2006].

Důležitou roli v apoptóze by mohly sehrát právě benzo(c)fenanthridinové alkaloidy (sanguinarin a chelerythrin).

Sanguinarin je schopen snižovat hladinu antiapoptotického proteinu Bcl-2 a zvyšovat hladinu proapoptotického Bax proteinu [Zdařilová et al., 2006]. Klíčovým faktorem pro apoptózu vyvolanou sanguinarinem je dále kaspáza-3 [Malíková et al., 2006]. Aktivace kaspázy-3 má, stejně jako Bax protein, proapoptotické účinky [Zdařilová et al.,

2006]. Sanguinarin také potlačuje cestu vedoucí k aktivaci jaderného transkripčního faktoru (NF- $\kappa$ B) [Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006]. NF- $\kappa$ B se podílí na regulaci exprese velkého počtu genů, které participují na regulaci apoptózy včetně vzniku nádorů, zánětů, septického šoku, virové replikace, aterosklerózy a dalších autoimunitních chorob [Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006]. Apoptóza zprostředkovaná sanguinarinem byla nalezena např. v buňkách lidského karcinomu prostaty, karcinomu prsu a dalších buněčných liniích [Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006].

V souvislosti s apoptózou by mohla hrát důležitou roli i produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) zprostředkovávající uvolnění cytochromu *c* a následnou apoptózu např. v buňkách srdečních myocytů [Malíková et al., 2006]. Akumulace reaktivních forem kyslíku hraje klíčovou roli právě při apoptóze buněk srdečního myocytu, indukované chelerythrinem [Slunská et al., 2010]. Chelerythrin, stejně jako sanguinarin, aktivuje kaspázu-3 a dále patří mezi inhibitory skupiny proteinů rodiny Bcl-2 [Zdařilová et al., 2006]. Chelerythrinem zprostředkovaná apoptóza byla zjištěna např. v buňkách karcinomu tlustého střeva nebo lidského neuroblastomu [Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006].

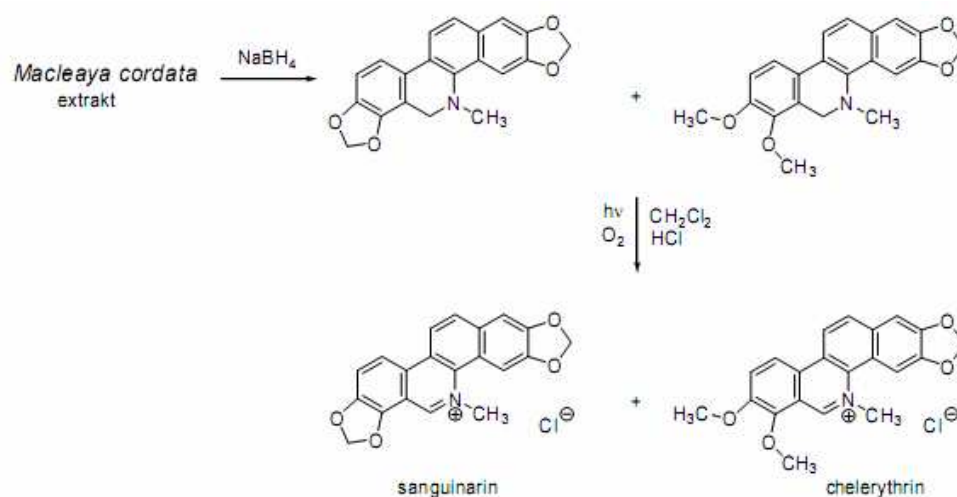
### **3.3.5 Přípravky obsahující směs sanguinarinu a chelerythrinu a jejich využití**

Směs sanguinarinu a chelerythrinu se získává z alkaloidového extraktu *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. pod názvem sanguiritrin (Obr. 13: převzato z Vičar et al., 2010, str. 25) [Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006; Zdařilová et al., 2008; Vičar et al., 2010] a dále z alkaloidového extraktu z oddenků *Sanguinaria canadensis* L. pod názvem sanguinaria [Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006; Stiborová et al., 2008; Vičar et al., 2010]. Obě tyto směsi mají široké uplatnění v přípravcích ústní hygieny, jako jsou zubní pasty a ústní vody [Dostál & Slavík, 2000; Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006; Absolínová et al., 2009; Slunská et al., 2010; Vičar et al., 2010] pro své antiplakové [Dostál & Slavík, 2000; Zdařilová et al., 2006; Slunská et al., 2010; Vičar et al., 2010], antimikrobiální, protizánětlivé a antimykotické účinky [Dostál & Slavík, 2000]. Známý je český výrobek Santoin zahrnující jak zubní pasty, tak ústní vody, který obsahuje právě směs sanguinarinu a chelerythrinu z *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. [Dostál & Slavík, 2000]. Dalším přípravkem, obsahující podobnou směs, je ruský přípravek Sanguiritrin,



používaný zevně pro své antimikrobiální účinky. Vnitřně je používán po myopatiích a následcích obrny (inhibice acetylcholinesterázy). Problémem užívání může být hepatotoxicita sanguinarinu [Dostál & Slavík, 2000]. Sanguiritrin z alkaloidového extraktu *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. se dále využívá jako veterinární přípravek a je aplikován pro mastoiditidu u krav [Malíková et al., 2006; Psotová et al., 2006 b].

Toxicita sanguinarinu byla sledována v experimentech *in vivo*. V 90-denní studii byl podáván jako přísada do krmení prasatům v denní dávce až 5 mg na 1 kg tělesné hmotnosti (p.o.). Tato studie zjistila, že použití sanguiritrinu bylo bezpečné. Podobná studie byla provedena i s potkany s denní perorální dávkou až 10 mg na 1 kg tělesné hmotnosti. 2% kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů bylo absorbováno přes gastrointestinální trakt (GIT) a 98% bylo vyloučeno stolicí [Malíková et al., 2006; Dvořák & Šimánek, 2007]. Ani při této studii nebyly pozorovány nežádoucí účinky sanguiritrinu [Dvořák & Šimánek, 2007]. Výše uvedené směsi kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů se proto používají jako aditiva do krmiv hospodářských zvířat, v EU známé jako SANGROVIT® (PHYTOBIOTICS Futterzusatzstoffe GmbH, Německo) [Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006; Vičar et al., 2010]. Součástí těchto směsí jsou kromě frakce



**Obr. 13:** Schéma dělení směsi sanguinarinu a chelerythrinu z extraktu *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.

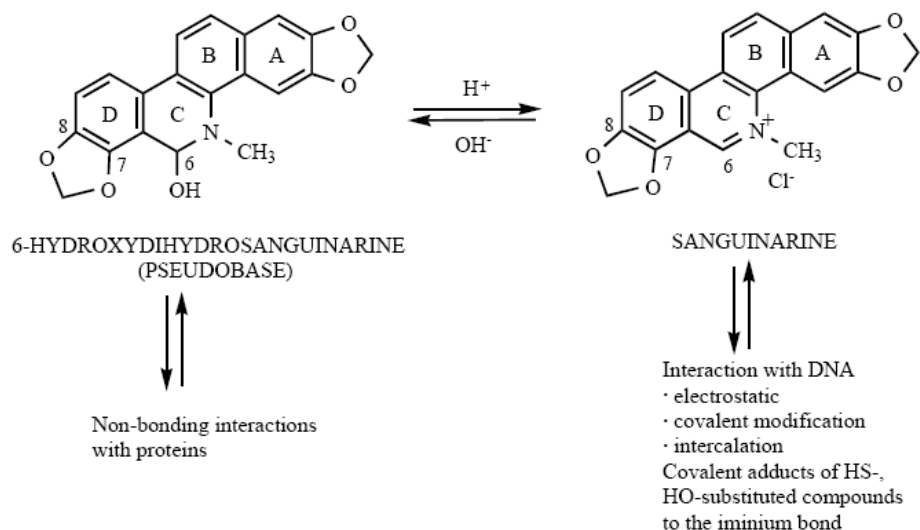
[převzato z Vičar et al., 2010]

kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů ještě neporušené nadzemní části *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. [Zdařilová et al., 2008]. Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy přidané do krmiva zvýšily užítkovost zvířat tím, že odstranily potřebu nízké hladiny antibiotik v krmivu, která mohla být spojena s rizikem rezistence na antibiotika [Psotová et al., 2006 b]. Stále otevřenou otázkou využití kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů pro tyto účely jsou jejich užité a případně i toxické, cytotoxické, hepatotoxické či genotoxické nežádoucí účinky. V případě SANGROVITU® byl zkoumán jeho možný toxický a genotoxický účinek při podávání vyšší než doporučené dávky v 90-denní studii perorální aplikace této směsi potkanům [Zdařilová et al., 2008]. Bylo zjištěno, že „nedocházelo k poškození DNA ani k tvorbě kovalentních aduktů DNA“ [Stiborová et al., 2008; Zdařilová et al., 2008]. Užívání SANGROVITU® bylo tudíž považováno za bezpečné [Zdařilová et al., 2008].

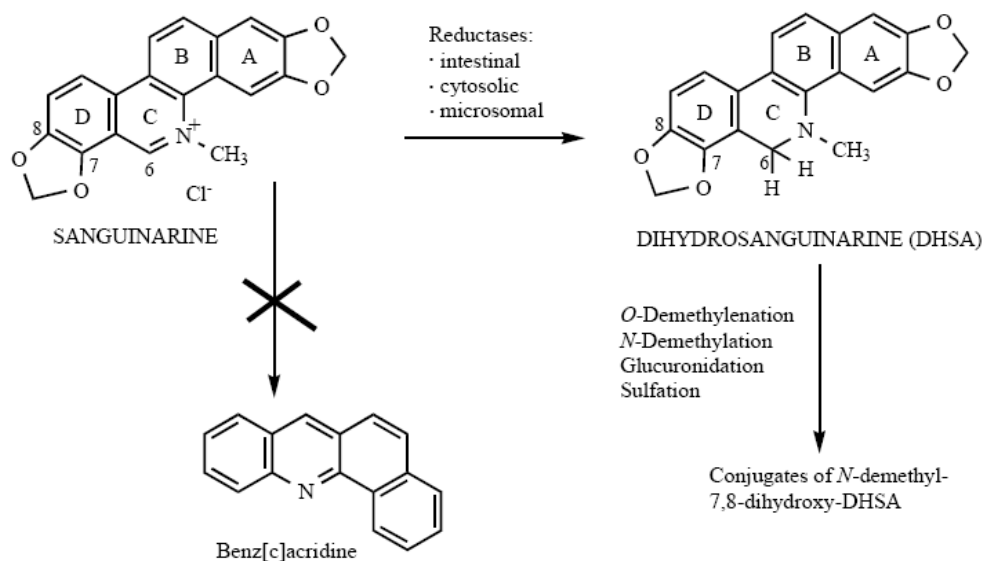
#### **4. Metabolismus kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů**

V souvislosti s metabolismem kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů je nutné zmínit jejich biosyntézu. Výchozími látkami jsou aromatické aminokyseliny tyrosin a fenylalanin, ze kterých se dále vytvářejí protopiny jako důležité meziprodukty biosyntézy kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů [Psotová et al., 2006 a; Zdařilová et al., 2006; Mackraj et al., 2008]. Posledním mezistupněm jejich biosyntézy je tvorba dihydroderivátů [Zdařilová et al., 2006] jako je např. dihydrosanguinarin. Ten vzniká po hydroxylaci protopinu v reakci závislé na NADPH [Psotová et al., 2006 a; Mackraj et al., 2008]. Reakce je katalyzována mikrosomálním systémem obsahujícím cytochrom P450 [Psotová et al., 2006 a; Mackraj et al., 2008]. Dihydroderiváty jsou dále oxidovány benzo(c)fenanthridinoxidázou na kvartérní soli [Zdařilová et al., 2006; Mackraj et al., 2008].

Nedávno bylo zjištěno, že prvním krokem v metabolismu sanguinarinu v organismu potkana, byla redukce iminiové vazby v kationtové formě, která vedla ke vzniku biologicky inaktivního a méně toxického dihydrosanguinarinu (DHSA). Je zřejmé, že tato cesta může být hlavní eliminační cestou sanguinarinu u savců [Psotová et al., 2006 a; Mackraj et al., 2008; Janovská et al., 2009]. Sanguinarin je sám o sobě, jak již bylo uvedeno dříve, v roztoku v rovnováze mezi formou kvartérního kationtu a pseudobází



**Obr. 14:** Rovnováha mezi pseudobází a iminiovou formou sanguinarinu  
 [převzato z Dvořák & Šimánek, 2007]



**Obr. 15:** Přeměna sanguinarinu na dihydrosanguinarin  
 [převzato z Dvořák & Šimánek, 2007 ]

(Obr. 14: převzato z Dvořák & Šimánek, 2007). V organismu je pak převeden na dihydrosanguinarin (Obr. 15: převzato z Dvořák & Šimánek, 2007). Tato reakce je pravděpodobně prvním krokem detoxikace sanguinarinu před jeho následným odstraněním

z organismu [Zdařilová et al., 2006; Dvořák & Šimánek, 2007; Mackraj et al., 2008; Janovská et al., 2009] např. organismu potkana [Dvořák & Šimánek, 2007]. Určitou roli v přeměně sanguinarinu na dihydrosanguinarin hraje NADH, přirozeně se vyskytující v cytoplasmě, který je právě schopen tuto přeměnu uskutečnit [Janovská et al., 2009].

K přeměně sanguinarinu na dihydrosanguinarin v rostlinách dochází za katalytického působení sanguinarinreduktázy. Také v rostlinách tato reakce představuje detoxikační cestu sanguinarinu [Dvořák & Šimánek, 2007]. Na rozdíl od sanguinarinu není výsledný dihydrosanguinarin cytotoxický a je předmětem i další biotransformace [Dvořák & Šimánek, 2007]. Dihydrosanguinarin je dále transformován na polární konjugáty, jejichž struktura nebyla doposud zcela objasněna [Psotová et al., 2006 a; Dvořák & Šimánek, 2007; Večeřa et al., 2007; Mackraj et al., 2008]. V nejnovější studii *in vitro* se zjistilo, že do metabolismu sanguinarinu je zapojená také oxidační dráha cytochrom P450-dependentní monooxygenací [Deroussent et al., 2010]. Ta je zprostředkována cytochromy P450 jaterních mikrosomů, které mohou metabolizovat sanguinarin na mutagenní epoxid [Mackraj et al., 2008].

Uvádí se, že metabolická transformace sanguinarinu začíná v trávicím (gastrointestinálním) traktu [Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006; Večeřa et al., 2007], a to údajně dosud neidentifikovanými reduktázami [Dvořák & Šimánek, 2007]. Jako možné reduktázy jsou uváděny střevní extracelulární reduktázy a dále pak buněčné cytosolové a mikrosomální reduktázy [Malíková et al., 2006; Dvořák & Šimánek, 2007]. V jiné literatuře je uváděno, že by transformace mohla probíhat pomocí mikrobiálních reduktáz [Zdařilová et al., 2006].

Jako jediný metabolický produkt biotransformace sanguinarinu u savců byl již od roku 1961 uváděn benzo(c)akridin (3,4-benzakridin) [Malíková et al., 2006; Psotová et al., 2006 b; Zdařilová et al., 2006]. Benzo(c)akridin byl považován za potenciálně karcinogenní a toxickou látku [Psotová et al., 2006 b; Zdařilová et al., 2006]. Tento domnělý metabolit sanguinarinu je však nyní označován za artefakt [Zdařilová et al., 2006].

V současnosti uváděným metabolitem sanguinarinu je dihydrosanguinarin, který byl identifikován jako metabolit sanguinarinu ve studii, ve které byla podána jedna perorální dávka sanguinarinu (10 mg/kg) potkanům [Psotová et al., 2006 b].

## **5. Metody určení struktury metabolitů kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů**

Mezi metody, používané k určení metabolitů kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů, se řadí metody chromatografické, jako jsou papírová chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kapalinová chromatografie (LC), a metody spektroskopické. Mezi ně patří hmotnostní spektrometrie za použití „elektrospray“ ionizace (ESI-MS).

V. Šimánek se spolupracovníky se pokoušeli detekovat přítomnost domnělého metabolitu sanguinarinu, benzo(c)akridinu, pomocí několika metod, jako byla chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a UV spektroskopie [Dvořák & Šimánek, 2007; Večeřa et al., 2007]. V těchto studiích nebyla tvorba benzo(c)akridinu jako metabolitu sanguinarinu nalezena [Dvořák & Šimánek, 2007]. Další použitou metodou byla papírová chromatografie [Psotová et al., 2006 a; Mackraj et al., 2008]. Výsledky získané touto metodou pouze naznačily, že byl benzo(c)fenanthridinový skelet transformován do benzo(c)akridinu [Mackraj et al., 2008]. Uvedený předpokládaný metabolit sanguinarinu nebyl určen ani metodami HPLC/ESI-MS [Večeřa et al., 2007] a LC-ESI-MS [Mackraj et al., 2008]. Pomocí metody LC-ESI-MS byla však úspěšně charakterizována biotransformace sanguinarinu a chelerythrinu na dihydroderiváty [Deroussent et al., 2010]. Identifikace benzo(c)akridinu uváděného jako metabolit sanguinarinu je v dřívějších studiích (Dvořák & Šimánek, 2007) založena na artefaktech a chybné interpretaci dat [Dvořák & Šimánek, 2007].

Pomocí metody HPLC/ESI-MS (vysoce citlivá metoda) byl identifikován redukční metabolit sanguinarinu, dihydrosanguinarin. Byl nalezen v plazmě a játrech potkanů, kterým byl sanguinarin podán perorálně [Mackraj et al., 2008; Deroussent et al., 2010]. V moči potkana tento metabolit však nalezen nebyl, stejně jako nebyla prokázána přítomnost sanguinarinu v moči [Deroussent et al., 2010].

Navrhovaná struktura metabolitu by však měla být potvrzena ještě pomocí NMR biologických vzorků např. tkání potkana [Deroussent et al., 2010].

## 6. Xenobiotika

Vzhledem k tomu, že pro živočišné organismy jsou kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy xenobiotiky, pojednává tato kapitola o takových látkách obecně.

Jak bylo uvedeno, xenobiotika patří mezi látky, které se v organismu přirozeně nevyskytují, tzn. nejsou tělu vlastní [Knejzlík et al., 2000]. Z hlediska mikrobiologie to jsou látky, se kterými se organismy žijící na zemi nesetkaly v průběhu celé evoluce [Knejzlík et al., 2000; Chromá et al., 2001]. Jinou skupinou látek jsou tzv. polutanty neboli látky přirozeně se vyskytující v přírodě (ropa, těžké kovy, polycyklické aromatické uhlovodíky, polycyklické aromatické nitrosloučeniny, fenoly, řada léčiv i parafarmaceutika a další) [Knejzlík et al., 2000; Stiborová et al., 2004]. Lidskou činností se tyto látky dostávají do okolního prostředí, kdy dochází k jeho znečištění [Knejzlík et al., 2000].

Existují dva typy zdrojů xenobiotik, a to primární, kam se řadí především chemický průmysl, a sekundární, což jsou oblasti lidské činnosti, kde se produkty chemického průmyslu používají [Knejzlík et al., 2000; Chromá et al., 2001]. V lékařství mezi xenobiotika řadíme syntetické léky jako chemoterapeutika či psychotropní látky. V potravinářství jsou to potravinářská aditiva jako ochucovadla či barviva. Dalším zdrojem xenobiotik je energetický průmysl, ve kterém se vytvářejí odpadní produkty jako oxid uhličitý, oxid siřičitý nebo popílek. Dalšími zdroji xenobiotik je doprava a spotřební průmysl [Knejzlík et al., 2000]. Sekundárním zdrojem xenobiotik je také např. zemědělství, kde se používají různé pesticidy či herbicidy [Knejzlík et al., 2000; Chromá et al., 2001].

Riziko poškození organismu je závislé na toxicitě látky, její koncentraci, době působení [Knejzlík et al., 2000] a akumulaci v prostředí [Chromá et al., 2001].

Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu probíhá v několik fázích. Xenobiotika nejprve vstupují do krevního řečiště, tam mohou interagovat s plazmatickými proteiny. Plazmatické proteiny, např. albumin, mohou sloužit jako transportéry těchto látek. Další fází je vstup látek do jednotlivých tělních buněk [Knejzlík et al., 2000].

Do krve se xenobiotika dostávají třemi způsoby. První způsob je pomocí trávicího ústrojí (žaludek, střeva), druhý respiračním systémem (plíce, průdušky, nosní sliznice) a třetí pokožkou [Knejzlík et al., 2000]. Vstup toxické látky do organismu závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Lipofilní látky mají usnadněný vstup do organismu, neboť epitel obsahuje vysoké množství lipidů. Některé látky, které se v organismu

nevyskytují, ale jsou značně podobné jeho endogenním sloučeninám, které plní v organismu fyziologické funkce, mají umožněný vstup do krve pomocí specifických kanálů (přenašečů). Tyto přenašeče jsou umístěny na povrchu buněk. Této schopnosti látek se využívá především ve farmacii. Část molekuly léku se fyziologicky shoduje s aktivní látkou [Knejzlík et al., 2000].

Po absorpci xenobiotika do krve dochází k druhé fázi transportu látky v organismu, tedy distribuci toxické látky do orgánů, tkání a cílových buněk. Krevní kapiláry, vytvářející bariéru mezi tkáněmi a krví, nejdéle zadržují krev a mají největší resorpční plochu. Nejnáchylnějším orgánem k působení xenobiotik je srdce. Při chronických otravách jsou nejvíce zasažena játra [Knejzlík et al., 2000].

První fáze (vstup xenobiotik do krevního řečiště) je vynechána při distribuci xenobiotik do buněk epitelů (žaludek, plíce, kůže). Tyto tkáně jsou tudíž vystaveny přímému působení xenobiotik. To se projevuje zvýšenou četností jejich onemocnění [Knejzlík et al., 2000].

## **6.1 Biotransformace xenobiotik**

Procesy, které vedou ke snadnému vyloučení či potlačení negativních vlastností xenobiotik v organismu nebo naopak ke zvýšení toxického účinku těchto látek se označují jako biotransformace [Chromá et al., 2001; Stiborová et al., 2004; Levová, 2009]. Při biotransformačních reakcích dochází ke dvěma způsobům ovlivňování xenobiotik. Buď dochází ke snížení toxicity látky (tento směr se označuje jako detoxikace xenobiotik), nebo je látka naopak aktivována, čímž dochází ke zvýšení toxicity látky. Tento směr biotransformace xenobiotik se označuje jako jejich aktivace [Chromá et al., 2001; Levová, 2009].

V průběhu evoluce se u jednotlivých organismů vyvinulo mnoho mechanismů detoxikace. Detoxikační procesy probíhají ve všech živých systémech a jsou důležité pro zachování jedince, neboť při vysokých koncentracích nebo dlouhodobém působení toxické látky dochází k nevratnému poškození organismu nebo i jeho zániku [Knejzlík et al., 2000].

V eukaryotických organismech probíhají především dvě fáze biotransformace xenobiotik [Knejzlík et al., 2000].

První fáze biotransformace xenobiotik zahrnuje několik chemických reakcí, a to oxidaci (hydroxylaci), deaminaci, dealkylaci, tvorbu epoxidů, sulfooxidaci, *N*-hydroxylaci, redukci (nitro-, azoredukce) a hydrolytické reakce (hydrolýza esterů a amidů) [Knejzlík et al., 2000; Chromá et al., 2001; Marková, 2003]. Těmito reakcemi dochází k přeměně molekuly cizorodé látky tak, aby mohlo dojít k její konjugaci s endogenními látkami, což patří do druhé fáze detoxikace [Knejzlík et al., 2000]. V první fázi biotransformace vznikají látky mnohem lépe rozpustné ve vodě než byla původní cizorodá látka, což zabraňuje jejich akumulaci v buňkách a dochází k vyloučení látek z těla ven [Knejzlík et al., 2000]. Někdy se tato fáze označuje jako funkcionalizační nebo derivatizační, neboť dochází k zabudovávání či demaskování funkčních skupin xenobiotika [Chromá et al., 2001; Marková, 2003]. Tím dochází, kromě zvýšené možnosti konjugace, též ke zvýšení polaritě látek [Chromá et al., 2001; Marková, 2003].

Na druhé fázi biotransformace xenobiotik se podílejí konjugační reakce. Dochází k reakci xenobiotika s endogenní sloučeninou nebo funkční skupinou za vzniku konjugátu [Knejzlík et al., 2000]. Konjugát je rozpustnější ve vodě než byla původní či demaskovaná látka [Knejzlík et al., 2000]. Sloučenina vstupující do konjugační reakce musí ve své molekule obsahovat skupinu, která je vhodná pro konjugaci. Poté vzniká konjugační produkt [Knejzlík et al., 2000]. Stejně jako v první fázi biotransformace xenobiotik, dochází i ve druhé fázi ke zvýšení polaritě původně hydrofobní látky, a tím se tak usnadní eliminace látky z buněk a exkrece z organismu močí a stolicí [Chromá et al., 2001; Marková, 2003; Levová, 2009].

## **6.2 Enzymy metabolizující cizorodé látky**

Schopnost biotransformovat xenobiotika vyžaduje „nespecifičnost“ k molekulární struktuře biotransformačních enzymů [Knejzlík et al., 2000].

Toxické látky se biotransformují především prostřednictvím membránově vázaných nespecifických enzymů, lokalizovaných v hladkém endoplazmatickém retikulu. Enzymy se označují jako mikrosomální (endoplazmatické retikulum se při homogenizační destrukci buněk rozbíjí na tělíska nazývaná jako mikrosomy) [Levová, 2009]. Mikrosomální enzymový systém může být jak indukován, tak inhibován. Při indukci může docházet ke zvýšenému metabolismu látky v orgánu. Mezi induktory patří především polycyklické

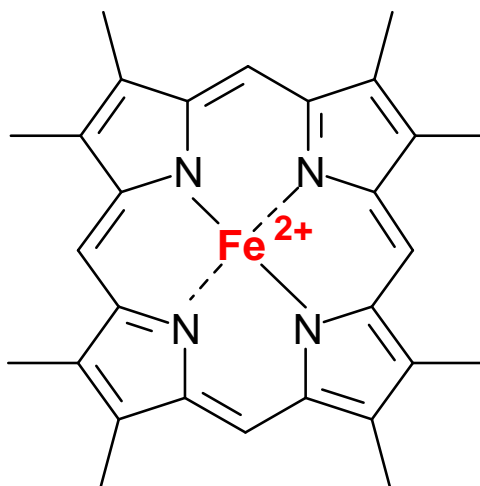


aromatické uhlovodíky, fenobarbital, ethanol a další. Při inhibici může docházet ke snížení enzymové aktivity, a tím ke snížení nebo zpomalení biotransformačních pochodů. To může mít za následek zabránění detoxikace škodlivé látky a následné urychlení či prohloubení „otravy“ organismu touto látkou [Levová, 2009].

V první fázi biotransformace xenobiotik v lidském organismu hrají důležitou roli monooxygenázový systém s cytochromem P450 jako terminální oxidázou, dioxygenázy, peroxidázy a hydrolázy [Knejzlík et al., 2000]. Nejdůležitějším enzymem této fáze je cytochrom P450, který patří do skupiny mikrosomálních monooxygenáz a je považován, jak již bylo uvedeno, za terminální oxidázu této skupiny [Stiborová et al., 2004]. Součástí mikrosomálního monooxygenázového systému je též NADPH:cytochrom P450 reduktáza a membrána endoplazmatického retikula [Levová, 2009].

Substrátem cytochromu P450 (CYP) jsou endogenní metabolity (steroidy, vyšší mastné kyseliny, prostaglandiny) a exogenní látky (léky, potravinová aditiva, průmyslové exhaláty). Takové látky se do organismu dostávají potravou, kůží a plícemi [Knejzlík et al., 2000].

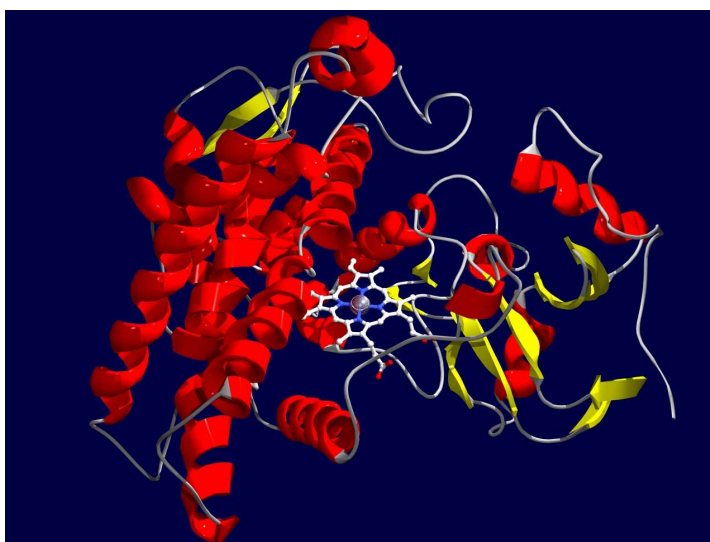
Cytochrom P450 je hemoprotein, jehož součástí je nekovalentně vázaný hem (Obr. 16) [Knejzlík et al., 2000; Chromá et al., 2001]. Cytochrom P450 v redukovaném stavu,



**Obr. 16:** Chemická struktura hemu

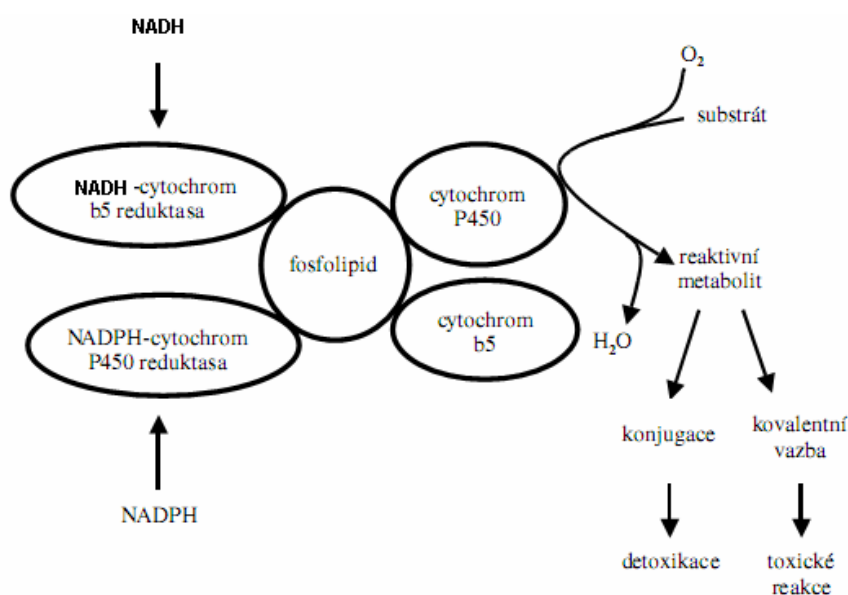
v komplexu s oxidem uhelnatým, vykazuje absorpční maximum při 450 nm díky neobvyklé vazbě hemového železa [Knejzlík et al., 2000; Levová, 2009]. Díky tomu získal označení P450 [Marková, 2003]. Cytochrom P450 se tak odlišuje od ostatních hemových proteinů, které při 450 nm neabsorbují [Levová, 2009]. Cytochrom P450 byl nalezen v rostlinách, savcích, rybách, hmyzu, houbách, kvasinkách, bakteriích a plísních [Knejzlík et al., 2000; Stiborová et al., 2004; Levová, 2009]. Jeho největší zastoupení je v jaterní tkáni, kde dochází k většině detoxikačních pochodů [Knejzlík et al., 2000; Levová, 2009].

Cytochrom P450 (Obr. 17: převzato z [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/), staženo 20.5.2010) lze z enzymologického hlediska zařadit do skupiny NADPH-O<sub>2</sub> dependentních monooxygenáz, které katalyzují hydroxylační reakce. NADPH je donorem elektronů monooxygenázového systému cytochromu P450. Elektrony jsou z NADPH přenášeny flavinovou cytochrom P450 reduktázou na terminální (konečný) hemoprotein P450, který váže kyslík, aktivuje ho a zabudovává jeho jeden atom do molekuly substrátu (Obr. 18: převzato z Knejzlík et al., 2000 a upraveno, str. 35) [Knejzlík et al., 2000]. V eukaryotických buňkách je systém cytochromu P450 vázán v membráně hladkého endoplazmatického retikula či mitochondrií [Stiborová et al., 2004].



**Obr. 17:** Struktura cytochromu P450 2B4

[převzato z [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/), staženo 20.5.2010]



**Obr. 18:** Schematické zobrazení komponent komplexu cytochrom P450

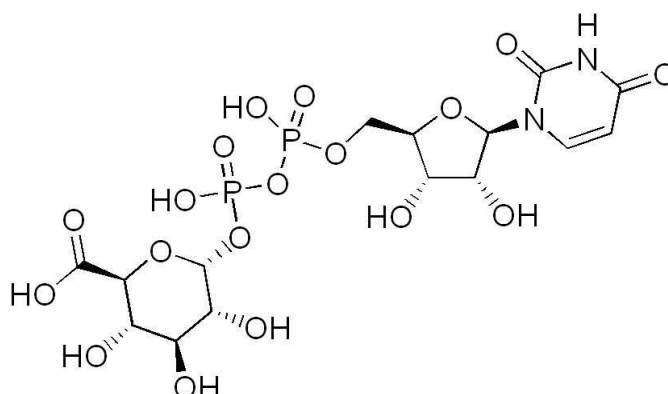
[převzato z Knejzlík et al., 2000 a upraveno]

Dalšími detoxikačními enzymy, katalyzujícími oxidačně-redukční reakce, jsou flavinové monooxygenázy, monoaminoxidázy, alkoholdehydrogenázy, aldehyddehydrogenázy, aldehydoxidázy a xanthinoxidázy. Na biotransformaci v játrech a placentě se podílí též peroxidázy. Hydrolýzu látek, obsahujících esterovou vazbu, katalyzuje karboxylesteráza. Karboxylesteráza je indukována lipofilními látkami a je nejvíce obsažena v jaterních buňkách [Knejzlík et al., 2000].

V druhé fázi biotransformace je největší část konjugčních reakcí katalyzována enzymy patřícími do třídy transferáz. Tyto enzymy jsou málo specifické vůči endogenní konjugční sloučenině [Knejzlík et al., 2000].

Nejdůležitější konjugční reakce je konjugace s kyselinou glukuronovou [Knejzlík et al., 2000], která má detoxifikační účinek [Marková, 2003]. Konjugční reakce s kyselinou glukuronovou se účastní nejvyšší počet xenobiotik, se kterými dochází ke tvorbě konjugátů, glukosiduronátů [Knejzlík et al., 2000; Marková, 2003]. Tuto reakci katalyzuje UDP-glukonosyltransferáza, donorem glukuronátu je UDP-glukuronová kyselina (Obr. 19: převzato z [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:UDP\\_glucuronic\\_acid.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:UDP_glucuronic_acid.png), staženo 20.5.2010, str. 36). UDP-glukonosyltransferáza představuje skupinu isoenzymů, které jsou z větší míry součástí membrán endoplazmatického retikula.

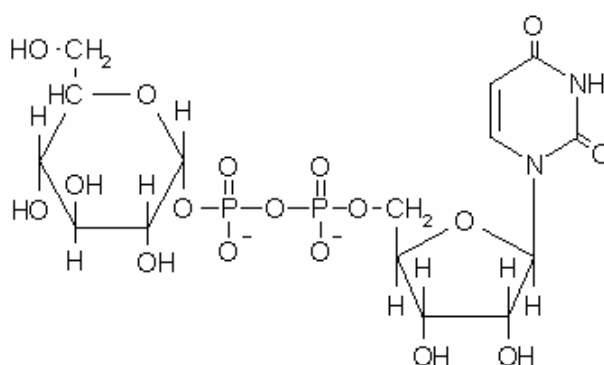
Jejich nejvyšší aktivita byla zjištěna v játrech, v menší míře dále v plicích, kůži a tenkém střevě [Knejzlík et al., 2000].



**Obr. 19:** Chemická struktura kyseliny UDP-glukuronové

[převzato z [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:UDP\\_glucuronic\\_acid.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:UDP_glucuronic_acid.png), staženo 20.5.2010]

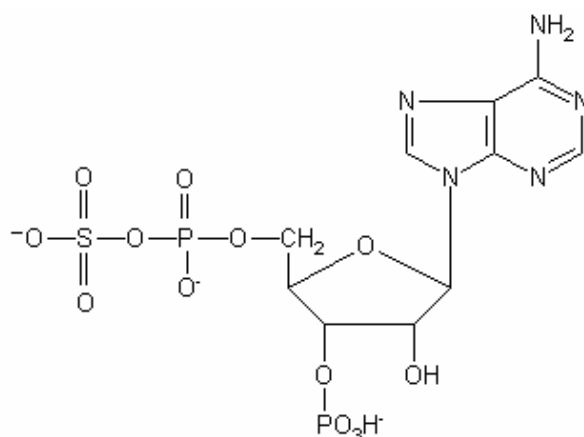
Další reakcí druhé fáze biotransformace xenobiotik je konjugace se sacharidy, a to především v rostlinách. Nejčastějším sacharidem, který vstupuje do konjugáčnících reakcí, je glukosa, a to ve formě UDP-glukosy (Obr. 20: převzato z [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=udp-glukosa](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=udp-glukosa), staženo 20.5.2010 a upraveno) za vzniku  $\beta$ -glukosidu [Knejzlík et al., 2000].



**Obr. 20:** Chemická struktura UDP-glukosy

[převzato z [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=udp-glukosa](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=udp-glukosa), staženo 20.5.2010 a upraveno]

Dále jsou součástí druhé fáze biotransformace reakce sulfatační, acetylační a methylační. Během sulfátové konjugace dochází k esterifikaci hydroxylované sloučeniny s kyselinou sírovou. Do této reakce vstupují především fenoly, alkoholy, katecholy a hydroxylaminy [Knejzlík et al., 2000]. Sulfát vystupuje v aktivované formě 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) (Obr. 21: převzato z <http://www.klif.no/publikasjoner/kjemikalier/1756/ta1756.html>, staženo 20.5.2010 a upraveno ) [Knejzlík et al., 2000; Marková, 2003]. Při sulfátové konjugaci může však dojít i k aktivaci



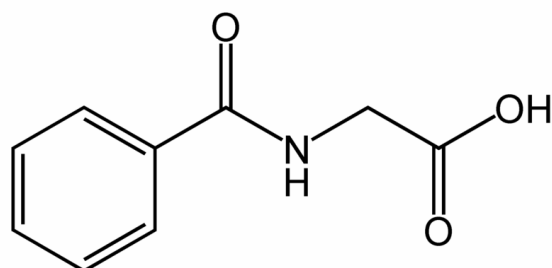
**Obr. 21:** Chemická struktura 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS)

[převzato z <http://www.klif.no/publikasjoner/kjemikalier/1756/ta1756.html>, staženo 20.5.2010 a upraveno]

cizorodé látky na toxičtější sloučeninu [Marková, 2003]. Důležitou metabolickou cestu pro látky obsahující aminoskupinu představuje acetylce. Tato reakce je katalyzována *N*-acetyltransferázou, vyskytující se v cytoplazmě [Knejzlík et al., 2000]. Stejně jako u sulfátové konjugace, může i u acetylce docházet k aktivaci cizorodé látky na toxičtější sloučeninu [Marková, 2003]. Nejméně významnou reakcí biotransformace xenobiotik je methylace. Při této reakci dochází k přenosu methylu z *S*-adenosylmethioninu na vhodný substrát prostřednictvím methyltransferázy [Knejzlík et al., 2000]. K methylačním reakcím dochází v cytosolu hepatocytů a buňkách nervového vlákna [Knejzlík et al., 2000].

Dalším typem konjugační reakce je peptidová konjugace. Během konjugačních reakcí s aminokyselinami dochází ke zvýšení rozpustnosti těchto látek. U savců nejčastěji probíhá konjugace s glycinem za vzniku hippurových kyselin (Obr. 22: převzato z [http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Hippuric\\_acid.png](http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Hippuric_acid.png), staženo 20.5.2010 str. 38).

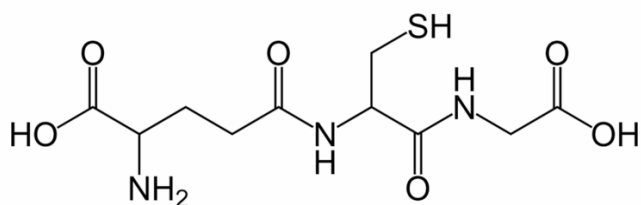
Peptidová konjugace probíhá v matrix mitochondrií, kde dochází k aktivaci aromatických kyselin pomocí Acyl-CoA-syntetáz na Acyl-CoA [Knejzlík et al., 2000].



**Obr. 22:** Chemická struktura kyseliny hippurové

[převzato z [http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Hippuric\\_acid.png](http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Hippuric_acid.png), staženo 20.5.2010]

V neposlední řadě se mezi reakce druhé fáze biotransformace řadí glutathionový systém detoxikace za vzniku konjugátů, merkapturových kyselin [Marková, 2003]. Hlavní sloučeninou, která se účastní těchto reakcí, je tripeptid  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin (glutathion) (Obr. 23: převzato z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Glutathione-skeletal.png>, staženo 20.5.2010) [Knejzlík et al., 2000]. Vyskytuje se ve všech buňkách těla a účastní se detoxikace celé řady xenobiotik. Glutathion-S-transferáza katalyzuje konjugaci glutathionu s elektrofilními sloučeninami, což urychluje exkreci toxických látek ledvinami [Knejzlík et al., 2000]. Glutathion-S-transferáza je přítomná v cytosolu a



**Obr. 23:** Chemická struktura glutathionu

[převzato z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Glutathione-skeletal.png>, staženo 20.5.2010]

mikrosomech jaterních buněk. Membránově vázaná glutathion-*S*-transferáza se nachází v blízkosti monooxygenázového systému cytochromu P450 [Knejzlík et al., 2000]. Látky, které prošly touto reakcí a mají hydrofobní charakter, mají snahu hromadit se v membránách endoplazmatického retikula. Dále mohou být modifikované monooxygenázovým systémem cytochromu P450 [Knejzlík et al., 2000]. Tato reakce má, stejně jako reakce s kyselinou glukuronovou, výrazný detoxifikační účinek [Marková, 2003].

Látky, biotransformované v játrech, se mohou dostat do žluči a dále do střeva a jsou vyloučeny stolicí. Nejdůležitějším exkrečním orgánem jsou však ledviny. Během glomerulární filtrace se xenobiotika vylučují v moči s ostatními endogenními metabolity. Plynné metabolity se z organismu vylučují plícemi [Knejzlík et al., 2000].

## **7. Enzymy metabolizující kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy**

Při studiu oxidační biotransformace sanguinarinu bylo testováno osm lidských cytochromů P450 (CYP). Pouze CYP1A1 a CYP1A2 byly při této biotransformaci účinné. Je tedy pravděpodobné, že CYP1A1 a CYP1A2 jsou zodpovědné za oxidační metabolickou cestu sanguinarinu v organismu. Sanguinarin by také mohl být oxidován CYP1A2 na hydroxylované metabolity. Jejich struktura však dosud není přesně určena. CYP1A1 zřejmě katalyzuje *O*-demethylaci sanguinarinu [Deroussent et al., 2010]. Oxidační cesta katalyzovaná CYP1A1, spojená s reakcemi katalyzovanými epoxidhydrolázou, by mohla hrát pro kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy detoxikační úlohu [Deroussent et al., 2010]. Transformace sanguinarinu na netoxický dihydrosanguinarin probíhá pravděpodobně působením NADPH:cytochrom P450-reduktázy [Matkar et al., 2008].

Dalším enzymem, který se podílí na biotransformaci sanguinarinu je sanguinarin-reduktáza (NAD(P)H: sanguinarinoxidoreduktáza). Sanguinarin-reduktáza je rostlinný enzym, který v rostlinách zabraňuje cytotoxickým účinkům benzofenanthridinových alkaloidů [Vogel et al., 2010]. Enzym byl izolován z buněčných kultur rostliny *Eschscholzia californica* jako rozpustný monomerní protein [Vogel et al., 2010].

### **7.1 Určení enzymů zodpovědných za metabolismus kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů jako cíl dalších studií**

Z dosavadních výsledků vyplývá, že by další výzkum v oblasti kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů měl být zaměřen na detailní určení enzymů biotransformujících tyto alkaloidy, spolu s identifikací struktury metabolitů, které byly dosud charakterizovány pouze částečně [Deroussent et al., 2010].

## **8. Závěr**

Cílem předkládané bakalářské práce bylo shrnutí dosavadních literárních poznatků (rešerže) o kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidech, především sanguinarinu a jeho příbuzných alkaloidech a poukázat na nové směry, které by měly být předmětem dalšího výzkumu. Cíle byly splněny.

Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy jsou rostlinnými produkty, nalezenými v celé řadě rostlin. Nejbohatším zdrojem je podle dosavadních studií rostlina z kmene *Chelidoniaeae* a čeledi *Papaveraceae* *Dicranostigma lactuoides* HOOK. f. et THOMS. Z hlediska chemické struktury je základem kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů (sanguinarinu, chelerythrinu, sanguirubinu, sanguiluthinu, chelirubinu, cheliluthinu a makarpinu) *N*-methylbenzo(c)fenanthridiniový kationt s různou substitucí základní struktury, především skupinami methoxylovými ( $-\text{OCH}_3$ ) a methyldioxidovými ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ). Chemická struktura kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů souvisí s jejich cytotoxickými vlastnostmi, se schopností interkalace do DNA a se schopností fluorescence. Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy se vyskytují ve dvou formách, mezi kterými funguje reverzibilní rovnováha v závislosti na pH prostředí. Kvartérní neboli iminiová forma je schopna interkalovat do DNA a pseudobáze neboli alkanolamin proniká přes buněčnou membránu. Molekulární forma kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů určuje jejich lokalizaci v buňkách.

Velmi důležité jsou biologické účinky kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů. Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy vykazují fluorescenční vlastnosti. Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy by tedy mohly být využity jako fluorescenční DNA sondy. Dále by se mohly uplatnit jako supravitální barviva nukleových kyselin.



Nejlepší barvicí schopnost byla nalezena pro makarpin. Součástí bakalářské práce je i popis jednotlivých biologických účinků sanguinarinu a chelerythrinu. Sanguinarin se využívá především pro své antiplakové a protizánětlivé účinky v ústní hygieně. Pro jeho působení proti srážlivosti krevních destiček může hrát důležitou roli v prevenci a léčbě kardiovaskulárních chorob. Sanguinarin je možné využít i jako potenciální cytostatikum k léčbě rakoviny. Chelerythrin má podobné využití v přípravcích ústní hygieny jako sanguinarin. Chelerythrin je znám i pro své antimykotické účinky na některé kmeny mikroorganismů. Velmi důležitým společným účinkem sanguinarinu a chelerythrinu je indukce apoptózy buněk. Přípravky obsahující směs obou alkaloidů se využívají nejen v ústní hygieně (zubní pasty, ústní vody), ale naleznou také uplatnění ve veterinárním odvětví (krmiva).

Méně prozkoumanou oblastí kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů je jejich metabolismus. Kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy se biosyntetizují z aromatických aminokyselin tyrosinu a fenylalaninu za vzniku protopinu jako meziprojektu. Posledním mezistupněm biosyntézy je tvorba dihydroderivátů. V metabolismu sanguinarinu v organismu je prvním krokem redukce iminiové vazby v kationtové formě vedoucí ke vzniku dihydrosanguinarinu, který je dále biotransformován na polární konjugáty. Tato cesta představuje detoxikační cestu jak v organismu savců, tak v rostlinách. Dihydrosanguinarin je v současnosti označován za metabolický produkt biotransformace sanguinarinu. Metabolické produkty biotransformace kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů se určovaly mnoha metodami, a to chromatografickými a spektroskopickými. Nejcitlivější metoda z nich je metoda HPLC/ESI-MS.

Otevřenou otázkou stále zůstává, které enzymy kvartérní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy v živočišných organismech metabolizují. Na biotransformaci kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů (sanguinarinu) v živém organismu se pravděpodobně podílejí cytochrom P450 1A1 a cytochrom P450 1A2. Cílem dalších studií proto bude určit další enzymy, které se na metabolismu kvartérních benzo(c)fenanthridinových alkaloidů podílejí.

## Seznam použitých zkratk

Bax	proapoptotický protein
Bad	proapoptotický protein
Bak	proapoptotický protein
Bcl-2	antiapoptotický protein
Bid	proapoptotický protein
Bik	proapoptotický protein
CoA	koenzym A
CYP	cytochrom P450
CYP1A1	cytochrom P450 1A1
CYP1A2	cytochrom P450 1A2
DHSA	dihydrosanguinarin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	„elektrospray“ ionizace
GC	guanin-cytosin
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHE	chelerythrin
CHL	cheliluthin
CHR	chelirubin
QBA	kvarterní benzo(c)fenanthridinové alkaloidy
LC	kapalinová chromatografie
M	mol/l
Mcl-1	antiapoptotický protein
MA	makarpin
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF-κB	jaderný faktor kappa B
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAPS	3`-fosfoadenosin-5`-fosfosulfát
PCD	programovaná buněčná smrt

p.o.	perorálně
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
SA	sanguinarin
SL	sanguiluthin
SR	sanguirubin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
UDP	uridindifosfát
UV	ultrafialová

## Seznam použité literatury

- Absolínová H., Jančář L., Jančářová I., Vičar J., Kubáň V.: *Acid-base behaviour of sanguinarine and dihydrosanguinarine*; Cent. Eur. J. Chem. 7, 876–883 (2009)
- Colombo M. L. & Bosisio E.: *Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae)*; Pharmacol. Res. 33, 127-134 (1996)
- Das S., Kumar G. S., Maiti M.: *Conversions of the left-handed form and the protonated form of DNA back to the bound right-handed form by sanguinarine and ethidium: A comparative study*; Biophys. Chem. 76, 199-218 (1999)
- Deroussent A., Ré M., Hoellinger H., Cresteil T.: *Metabolism of sanguinarine in human and in rat: Characterization of oxidative metabolites produced by human CYP1A1 and CYP1A2 and rat liver microsomes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; J. Pharm. Biomed. Anal. 52, 391-397 (2010)
- Dostál J.: *Two Faces of Alkaloids*; J. Chem. Educ. 77, 993-998 (2000)
- Dostál J., Bochořáková H., Táborská E., Slavík J., Potáček M., Buděšínský M., de Hoffmann E.: *Structure of Sanguinarine Base*; J. Nat. Prod. 59, 599-602 (1996)
- Dostál J., Slavík J.: *Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech*; Chem. Listy 94, 15–20 (2000)
- Dvořák Z., Šimánek V.: *Metabolism of Sanguinarine: The Facts and The Myths*; Curr. Drug Metab. 8, 173-176 (2007)
- Hădărugă D. I. & Hădărugă N. G.: *Antioxidant activity of *Chelidonium majus* L. extracts from the Banat county*; J. Agroaliment. Proc. Technol. 15, 396-402 (2009)
- [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:UDP\\_glucuronic\\_acid.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:UDP_glucuronic_acid.png),  
staženo 20.5.2010
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Glutathione-skeletal.png>,  
staženo 20.5.2010
- [http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Hippuric\\_acid.png](http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Hippuric_acid.png),  
staženo 20.5.2010
- [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=udp-glukosa](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=udp-glukosa),  
staženo 20.5.2010
- <http://www.asianflora.com/Papaveraceae/Dicranostigma-lactuoides.htm>,  
staženo 6.3.2010
- <http://www.asianflora.com/Papaveraceae/Macleaya-cordata.htm>,

staženo 6.3.2010

[http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=phototheque\\_result&lettre=c](http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=phototheque_result&lettre=c),

staženo 6.3.2010

<http://www.klif.no/publikasjoner/kjemikalier/1756/ta1756.html>,

staženo 20.5.2010

[http://www.missouriplants.com/Whitealt/Sanguinaria\\_canadensis\\_page.html](http://www.missouriplants.com/Whitealt/Sanguinaria_canadensis_page.html),

staženo 6.3.2010

Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: **Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí**; Chem. Listy 95, 212-222 (2001)

Janovská M., Kubala M., Šimánek V., Ulrichová J.: **Fluorescence of sanguinarine: fundamental characteristics and analysis of interconversion between various forms**; Anal. Bioanal. Chem. 395, 235-240 (2009)

Jeng J.-H., Wu H.-L., Lin B.-R., Lan W.-H., Chang H.-H., Ho Y.-S., Lee P.-H., Wang Y.-J., Wang J.-S., Chen Y.-J., Chang M.-Ch.: **Antiplatelet effect of sanguinarine is correlated to calcium mobilization, thromboxane and cAMP production**; Atherosclerosis 191, 250-258 (2007)

Knejzlík Z., Káš J., Ruml T.: **Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace**; Chem. Listy 94, 913-918 (2000)

Krane B. D., Fabule M. O., Shamma M., Gözler B.: **The benzophenanthridine alkaloids**; J. Nat. Prod. 47, 1-43 1984

Levová K.: **Metabolická detoxikace karcinogenních aristolochových kyselin cytochromy P450**; Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, 9-32 (2009)

Mackraj I., Govender T., Gathiram P.: **Sanguinarine**; Cardiovasc. Ther. 26, 75-83 (2008)

Malíková J., Zdařilová A., Hlobílková A.: **Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis**; Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 150, 5–12 (2006)

Marek R., Toušek J., Dostál J., Slavík J., Dommissie R., Sklenář V.: **<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR study of quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids**; Magn. Reson. Chem. 37, 781–787 (1999)

Marková V.: **Studium vlivu aristolochových kyselin a sudanu I na enzymy biotransformující xenobiotika v organismu potkana**; Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, 14-22 (2003)

- Matkar S. S., Wrischnik L. A., Hellman-Blumberg U.: [Production of hydrogen peroxide and redox cycling can explain how sanguinarine and chelerythrine induce rapid apoptosis](#), Arch. Biochem. Biophys. 477, 43-52 (2008)
- Moro P. A., Cassetti F., Giugliano G., Falce M. T., Mazzanti G., Menniti-Ippolito F., Raschetti R., Santuccio C.: [Hepatitis from Greater celadine \(\*Chelidonium majus\* L.\): Review of literature and report of a new case](#); J. Ethnopharmacol. 124, 328–332 (2009)
- Psotová J., Klejdus B., Večeřa R., Kosina P., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: [A liquid chromatographic-mass spectrometric evidence of dihydrosanguinarine as a first metabolite of sanguinarine transformation in rat](#); J. Chromatogr. B 830, 165-172 (2006)
- Psotová J., Večeřa R., Zdařilová A., Anzenbacherová E., Kosina P., Svobodová A., Hrbáč J., Jirkovský D., Stiborová M., Lichnovský V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: [Safety assessment of sanguiritrin, alkaloid fraction of \*Macleaya cordata\*, in rats](#); Vet. Med. 51, 145-155 (2006)
- Serafim T. L., Matos J. A. C., Sardão V. A., Pereira G. C., Branco A. F., Pereira S. L., Parke D., Perlina E. L., Moreno A. J. M., Holy J., Oliveira P. J.: [Sanguinarine cytotoxicity on mouse melanoma K1735-M2 cells – Nuclear vs. mitochondrial effects](#); Biochem. Pharmacol. 76,1459–1475 (2008)
- Slaninová I., Slanina J., Táborská E.: [Quaternary Benzo\(c\)phenanthridine Alkaloids- Novel Cell Permeant and Red Fluorescing DNA Probes](#); Cytometry Part A 71, 700-708 (2007)
- Slaninová I., Slanina J., Táborská E.: [Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo\(c\)fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond](#); Chem. Listy 102, 427–433 (2008)
- Slunská Z., Gelnarová E., Hammerová J., Táborská E., Slaninová I.: [Effect of quaternary benzo\(c\)phenanthridine alkaloids sanguilutine and chelilutine on normal and cancer cells](#); Toxicol. in Vitro, in press (2010)
- Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J.: [Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí](#); Chem. Listy 98, 876-890 (2004)
- Stiborová M., Vostalová J., Zdařilová A., Ulrichová J., Hudeček J., Tschirner K., Šimánek V.: [Macleaya cordata extract and Sangrovit® genotoxicity. Assessment in vivo](#); Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 152, 35-39 (2008)

- Suchomelová J., Bochořáková H., Paulová H., Musil P., Táborská E.: [HPLC quantification of seven quaternary benzo\(c\)phenanthridine alkaloids in six species of the family \*Papaveraceae\*](#); J. Pharm. Biomed. Anal. 44, 283-287 (2007)
- Urbanová J., Lubal P., Slaninová I., Táborská E., Táborský P.: [Fluorescence properties of selected benzo\(c\)phenanthridine alkaloids and studies of their interaction with CT DNA](#); Anal. Bioanal. Chem. 394, 997-1002 (2009)
- Urbanová J., Lubal P., Táborská E., Táborský P.: [Interakce benzo\(c\)fenantridinových kvarterních alkaloidů s DNA](#); Chem. Listy 103, 207–211 (2009)
- Večeřa R., Klejdus B., Kosina P., Orolin J., Stiborová M., Smrček S., Vičar J., Dvořák Z., Ulrichová J., Kubáň V., Anzenbacher P., Šimánek V.: [Disposition of sanguinarine in the rat](#); Xenobiotica 37, 549-558 (2007)
- Vičar J., Soural M., Hlaváč J.: [Separace kvartérních benzo\(c\)fenanthridinových alkaloidů z \*Macleaya cordata\*](#); Chem. Listy 104, 51-53 (2010)
- Vogel M., Lawson M., Conrad W. S. U., Ross W.: [Sanguinarine reductase- structure and mechanism of an enzyme of alkaloid detoxication](#); Bioch. Mol. Biol., in press (2010)
- Vrublová E., Vostalová J., Večeřa R., Klejdus B., Stejskal D., Kosina P., Zdařilová A., Svobodová A., Lichnovský V., Anzenbacher P., Dvořák Z., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: [The toxicity and pharmacokinetics of dihydrosanguinarine in rat: A pilot study](#); Food Chem. Toxicol. 46, 2546-2553 (2008)
- [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/), staženo 20.5.2010
- Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: [Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky in vitro a in vivo](#); Chem. Listy 100, 30-41 (2006)
- Zdařilová A., Vrublová E., Vostalová J., Klejdus B., Stejskal D., Prosková J., Kosina P., Svobodová A., Večeřa R., Hrbáč J., Černochová D., Vičar J., Ulrichová J., Šimánek V.: [Natural feed additive of \*Macleaya cordata\*: Safety assessment in rats a 90-day feeding experiment](#); Food Chem. Toxicol. 46, 3721–3726 (2008)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

<b>Jméno a příjmení</b>	<b>Adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>